

VISIT...

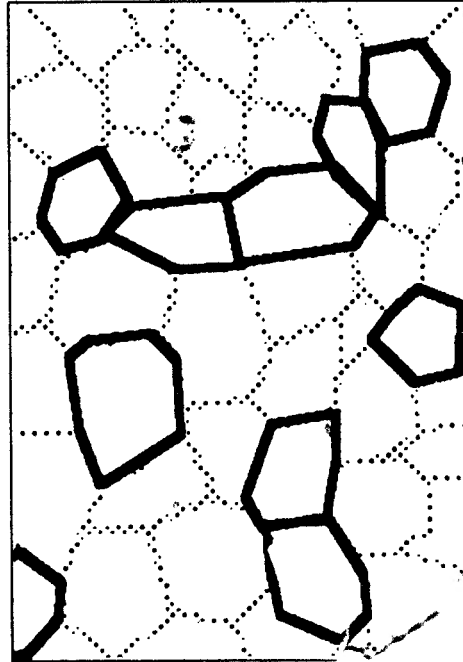
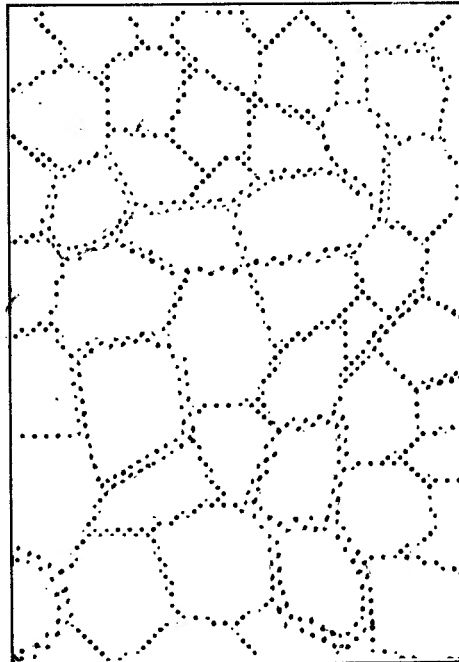
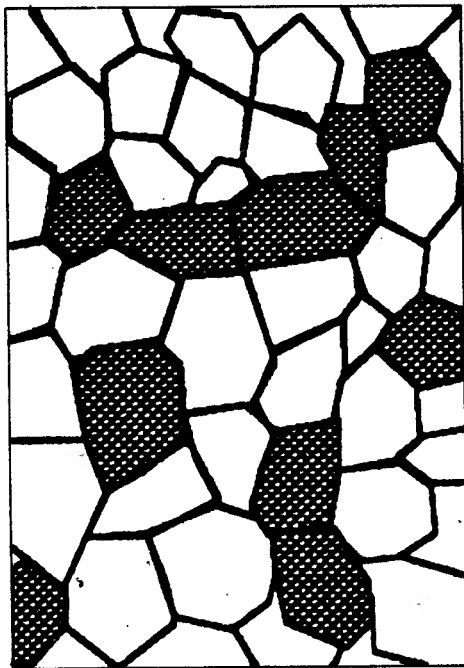
LANZAROTE
Caliente.COM

Дж. Уилсон
Т. Хант

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

СБОРНИК ЗАДАЧ

Издательство «Мир»



Молекулярная биология клетки

СБОРНИК ЗАДАЧ

Molecular Biology of the Cell

John Wilson
Tim Hunt

THE PROBLEMS BOOK

Garland Publishing, Inc.
New York London

Дж. Уилсон
Т. Хант

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

СБОРНИК ЗАДАЧ

Перевод с английского
канд. биол. наук А. Д. Морозкина,
канд. биол. наук Г. И. Эйснер,
А. В. Никашина,
канд. биол. наук В. М. Маресина
под редакцией
канд. биол. наук И. А. Крашенинникова



Москва «Мир» 1994

ББК 28.070
У36
УДК 576.32/36

У36 Уилсон Дж., Хант Т.
Молекулярная биология клетки: Сборник задач: Пер.
с англ.—М.: Мир, 1994.— 520 с., ил.
ISBN 5-03-001999-5

Книга американских авторов — приложение ко 2-му изданию учебника «Молекулярная биология клетки» Б. Албертса, Д. Брея, Дж. Льюиса и др. Содержит вопросы и задачи, цель которых — углубить понимание текста учебника, научить планировать эксперимент (в области биохимии, цитологии, физиологии клетки, молекулярной биологии) и критически оценивать результаты.

У $\frac{1903010000-008}{056(01)-94}$ КБ-7-93-237

ББК 28.070

Редакция литературы по биологии

Федеральная целевая программа книгоиздания России

ISBN 5-03-001999-5 (русск.)
ISBN 0-8240-3697-2 (англ.)

© 1989 by John Wilson and Tim Hunt.
© перевод на русский язык,
А. Д. Морозкин, Г. И. Эйсер,
А. В. Никашин, В. М. Маресин, 1994

От редакции

Предлагаемая вниманию читателя книга — одно из тех современных учебных руководств, которые в последнее время стали выпускать ведущие книгоиздательские фирмы США как приложения к биологическим учебникам мирового класса. Сборник задач достойно дополняет замечательный учебник «Молекулярная биология клетки» Б. Албертса и соавт., 2-е издание которого одновременно выпускает издательство «Мир».

Книга содержит вопросы и задачи, подобранные таким образом, чтобы углубить понимание основ молекулярной и клеточной биологии и развить творческий подход у начинающего исследователя. Особенно интересны многочисленные проблемные задачи, основанные на материалах конкретных научных статей; такие задачи не только знакомят с методологией предмета (точнее — предметов, поскольку охват научных направлений очень широк),

не только дают представления об истории накопления знаний, но и увлекают читателя тем блеском научного творчества, который свойствен лучшим работам, изложенным здесь в виде текста задач.

Редакция надеется, что выпуск этой книги на русском языке будет с одобрением встречен студентами, аспирантами и преподавателями биологических факультетов университетов и молодыми специалистами научно-исследовательских институтов.

Нужно отметить, что в английское издание книги ответы на многие задачи не включены. Эти ответы авторы поместили в отдельную брошюру, предназначенную для преподавателей. На русском языке эти два издания объединены, т. е. все задачи снабжены ответами. Работа по переводу книги распределялась следующим образом: А. Д. Морозкин — главы 5, 6, 7, 8; Г. И. Эйсер — главы 9, 10; А. В. Ни-
кашин — главы 11, 12; В. М. Маресин — главы 13, 14.

Предисловие к английскому изданию

Данный сборник задач служит приложением ко второму изданию «Молекулярной биологии клетки» (МБК) Б. Албертса, Д. Брэя, Дж. Льюиса, М. Рэффа, К. Робертса и Дж. Уотсона. Он предназначен для того, чтобы вовлечь читателя в активное изучение принципов клеточной биологии. Мы убеждены, что для наиболее полного усвоения основных понятий их нужно всесторонне разобрать, подвергнуть сомнению и «поиграть» с ними. Сборник задач, стимулирующий критический подход к проблемам молекулярной биологии, послужит, как мы надеемся, полезным дополнением к основному учебнику с его элегантным изложением материала. В учебниках материал обычно представляется в максимально упрощенном виде, чтобы у читателя не возникало никаких вопросов. Однако если ничто не вызывает сомнения, то определенная часть богатства и глубины предмета оказывается утерянной. Имея это в виду, мы предлагаем в задачнике вопросы трех типов: простые общие вопросы, более трудные вопросы на сообразительность и задачи, основанные на анализе экспериментов. Все они связаны с материалом МБК и служат последовательным комментарием, который должен помогать изучению и прежде всего облегчать понимание текста учебника.

Наша главная цель — познакомить читателя с экспериментальными основами клеточной и молекулярной биологии и помочь лучше разобраться во взаимосвязях между поведением молекул и биологией клетки. Экспериментирование — это единственный способ раскрыть природные механизмы, а наши знания полны лишь настолько, насколько позволяют проведенные эксперименты. В повседневной практике экспериментальной биологии половина успеха состоит в том, чтобы правильно поставить вопрос, а вторая половина — в том, чтобы найти способ ответить на него. В биологии редко удается получить новые данные, просто сидя в кресле и размышляя. К сожалению, никакая книга не может заменить непосредственную работу в лаборатории, однако мы всячески старались передать остроту процесса исследования, в особенности ход мысли от

наблюдений к интерпретации. Большинство представленных задач основано на реальных экспериментах. Некоторые из них взяты из классических статей по биологии клетки, некоторые — из работ, внесших решающий вклад в формирование современных представлений, а некоторые — из самых последних публикаций, появившихся в печати буквально во время составления задач. Все задачи предназначены активно вовлекать читателя в обдумывание экспериментов, на которых базируются наши знания о биологии клетки.

Самым трудным делом оказался поиск работ, которые можно было бы превратить в подходящие задачи. Постоянную помощь в этом оказывали авторы МБК, а также друзья и коллеги. Однако публикации, по которым можно сделать действительно хорошие задачи, весьма редки. Большинство работ, даже самых интересных и значительных, довольно трудно изложить в форме задачи. Как правило, отобранные работы при представлении их в виде задач были значительно упрощены. Мы выбирали из работ несколько основных пунктов и приводили ровно столько информации, сколько необходимо, чтобы найти ответ. Конечно, реальная жизнь в лаборатории не такова, какой она выглядит в этих задачах: редко случается, что можно взглянуть на одну-единственную чашку Петри и понять, что в генетическом коде используются перекрывающиеся триплеты. Кроме того, в своем стремлении упростить мы обращались с данными таким образом, что в некоторых случаях стоит принести извинения авторам работ. Однако мы прилагали все усилия, чтобы не исказить смысл и логику работы, и надеемся, что у читателей возникнет желание более детально познакомиться со многими из использованных нами замечательных статей.

Составление задач потребовало много времени и труда, тем не менее почти всегда это было увлекательное и приятное занятие. Мы очень надеемся, что хотя бы отчасти это удовольствие испытают и наши читатели. Цель задачника — выявлять и объяснять, а не запутывать и сбивать с толку.

Благодарности

Мы благодарны нашим многочисленным друзьям и коллегам, которые терпели все вопросы и знакомили нас с областями, где мы не были специалистами. В особенности мы благодарны Б. Браун, Л. Бирнбаумер, Л. Дейвис, К. Дингуолл, Дж. Голлу, Дж. Гилберту, Б. Гамбинеру, Б. Гупте, Р. Хафнеру, Э. Хертцбергу, Э. Хаксли, Хью Хаксли, М. Ирвингу, С. Корнфелду, П. Лазароу, П. Муру, Э. Мюррью, Г. Петско, Дж. Пайпасу, Дж. Райн, Дж. Ротману, Дж. Силва, Дж. Торнеру, Л. Тилни и Р. Трейсману.

Мы выражаем признательность за подготовку замечательных задач Д. Эллису, С. Берджет, Хью-Бао Чангу, Р. Диас-Аррастиа, Э. Эдвардсу, С. Фуллилав, С. Халфорду, Минг-Дерг Лаю, П. Лунду, К. Майер, Д. Мовшовитц, Э. Мюррею, Х. Кави, Д. Роту, Ш. Йодер Рот и Э. Вайсу.

Все эти задачи мы предлагали студентам. Их комментарии и критические замечания оказались весьма полезными и позволили устранить многие ошибки, двусмысленности и многословие. В особенности мы благодарны М. Кригеру, Э. Чан и П. Кайзеру, которые решили почти все задачи, но мы также весьма признательны всем студентам, которые просмотрели черновики глав и внесли свои конструктивные предложения: Л. Годли, Л. Грумбах, К. Ким, Р. Лаки, М. Лин, Дж. Любке, Н. Майер, Дж. Рэффу, Р. Ричардсон, Э. Розенфелду, Д. Скаурас, Фай Ф. Ши, Г. Ши, К. Стайн, И. Сунеру и Дж. Винограду.

В неоплатном долгу мы перед д-ром Аластером Юингом. Он проработал все задачи, собрал все комментарии студентов, решавших их, и дал много мудрых рекомендаций относительно стиля и содержания. Его работа в значительной степени улучшила весь задачник и уберегла нас от ряда досадных ошибок.

Мы благодарим Д. Брюер, М. Риделл, Л. Томас и К. Уинтер за подготовку рукописи и решение многих организационных вопросов. Наши поиски литературы в значительной мере были облегчены дружеской помощью работников библиотек следующих учреждений: Кембриджского университета, Королевского фонда исследований рака в Лондоне, Лаборатории биологии моря в Вудс-Холле, Массачусетс, кафедр биологии, биохимии и молекулярной биологии Калифорнийского университета в Беркли (благодарим Б. Эймса и Дж. Гер-

харта) и Медицинского училища Р.У. Джонсона в Нью-Джерси (благодарим Дж. Дунена). Р. Брукс и Р. Саммерс помогли нам сделать некоторые фотографии, а К. Морита проконсультировала нас по компьютерной графике. Мы благодарим П. Уолтера за радиоавтограф геля для определения последовательности нуклеотидов, представленной на рис. 5-45. Особенно мы признательны студентам старших курсов Кембриджа, предоставивших данные, изображенные на рис. 5-4 и 10-3, которые были получены на практических занятиях.

С самого начала мы тесно сотрудничали с Б. Албертсом, Д. Брэйем, Дж. Льюисом, М. Рэффом и К. Робертсом. Они воодушевляли нас и своими познаниями помогали преодолевать многие узкие места. В особенности это касается иллюстраций, которые по совету К. Робертса были значительно улучшены. Кроме того, мы благодарим М. Робертсон за ее мудрые советы и постоянную поддержку, а также Дж. Уотсона за ободрение и дружеское расположение.

Работу по написанию задачника облегчала та атмосфера доброжелательности, в которой она протекала. В особенности мы благодарны Шейле Арчибалд за предоставление гостеприимного крова в загородном доме под Лондоном, а также Энн и Люси за приготовление такой вкусной еды, которая сама по себе давала образование в области кулинарии. Мы не смогли бы завершить работу без профессиональной помощи персонала издательства Гарланд, в особенности П. Бессас, Ш. Коберт, Дж. Кониг и Э. Уолкер. Совершенно без усталости работала Р. Адамс: она находила студентов, которые просматривали рукопись, координировала их усилия, разрабатывала график работы и по мере необходимости стимулировала нас к работе. Особый долг благодарности мы испытываем по отношению к Г. Бордену, инициатору всей этой затеи, поддерживавшему работу над задачником на всех этапах ее длительного развития. Он облегчал трудности, возникающие при написании, и вдохновлял нас на подвиги. Наконец, в заключение мы хотим выразить благодарность нашим семьям, друзьям, коллегам и студентам за терпение и поддержку в течение всех этих лет, когда мы были отвлечены от других наших обязанностей. Всем им, в особенности Х. Эпштейн, Ч. Колтер, С. Берджет и Л. Томас, мы выражаем нашу сердечную признательность.

К читателям

Сборник задач задуман как дополнение к центральным, основополагающим частям «Молекулярной биологии клетки» (МБК, гл. 5–14). Каждая глава задачника содержит разделы, соответствующие разделам второго издания МБК (ссылки всюду представлены). Для решения задач необходимо ознакомиться с материалом основной книги. Каждая глава начинается с вопросов, предназначенных помочь читателям составить общее представление о прочитанном и проверить свое понимание текста. Вопросы, в которых нужно заполнить пропуски, (в основном это словарные тесты) включают определения большинства терминов, использованных в МБК; вопросы, требующие ответа «правильно–неправильно», касаются ключевых гипотез и важнейших факторов. На все вопросы даны ответы в конце книги.

Главная смысловая часть каждого раздела – задачи, составленные на основе опубликованных научных работ. В них встречается много трудных моментов, поэтому они потребуют от читателя большого внимания. Некоторые, впрочем, очень просты и сводятся, например, всего лишь к расшифровке генетического кода. Встречаются и весьма спорные положения, так что мы удивились бы, если бы даже опытные экспериментаторы в области клеточной биологии смогли решить их без одного или двух предлагаемых нами намеков. Большая часть задач, однако, средней трудности. Во всех случаях

мы старались ставить вопросы так, чтобы вести читателя к решению через ряд последовательных этапов. Ответы позволяют читателям быстро проверить как ход своих рассуждений, так и знание теории. Мы рекомендуем читателю в каждом случае приложить все усилия, чтобы решить задачу самостоятельно, и только потом посмотреть ответ. Надеемся, что задачи будут полезны и преподавателям для составления домашних заданий, проведения семинаров, возможно, формулирования экзаменационных вопросов.

Многие задачи в книге включают расчеты. Там, где расчеты основаны на уравнении, мы приводим само уравнение с кратким объяснением обозначений. Многие расчеты, однако, связаны непосредственно с преобразованием информации из одной формы в другую. В расчетах обоих типов используются константы и коэффициенты пересчета, которых может не быть в задаче. Все они приведены в справочных таблицах в конце книги (там же дан генетический код и однобуквенные обозначения аминокислот). В ответы к задачам мы включили единицы измерения (наименования) для каждого элемента расчета. Анализ единиц измерения – очень важная часть любых расчетов, и мы настоятельно рекомендуем этот подход. Если вычисления проведены так, что в ответе после сокращений остаются требуемые единицы измерения, то за цифровой результат можно не волноваться.

Основные генетические механизмы

Синтез РНК и белка (МБК 5.1)¹

5-1 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. _____ катализирует синтез РНК-копии на цепи ДНК в ходе процесса, называемого _____.
- Б. Синтез РНК начинается на _____ ДНК и заканчивается на особом участке ДНК, называемом _____.
- В. _____ в молекуле тРНК построен таким образом, что его основания образуют пары с комплементарной последовательностью из трех нуклеотидов, называемой _____, в молекуле мРНК.
- Г. Ферменты, называемые _____, присоединяют каждую аминокислоту к соответствующей молекуле тРНК, образуя молекулу _____.
- Д. Генетический код называют _____, потому что большинство аминокислот представлено более чем одним кодоном.
- Е. В _____ имеются два участка связывания молекулы тРНК: _____, или Р-участок, удерживающий молекулу тРНК, присоединенную к растущему концу полипептидной цепи, и _____, или А-участок, предназначенный для удерживания молекулы тРНК, нагруженной аминокислотой.
- Ж. Образование пептидной связи катализируется _____, каталитическая активность которой, как считают, управляется крупной молекулой _____, входящей в состав большой субъединицы рибосомы.
- З. Белки, называемые _____, связываются со _____ кодонами в А-участке рибосомы, в результате чего пептидилтрансфераза гидролизует связь, которая соединяет растущий пептид с молекулой тРНК.
- И. Во всех клетках первую аминокислоту, с которой начинается любая белковая цепь, доставляет молекула особой _____, узнающей кодон AUG и несущей аминокислоту _____.

5-2 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Направление движения РНК-полимеразы зависит от связывания с промотором, а выбор матричной цепи — от дополнительных белковых факторов.
- Б. В любом месте двойной спирали ДНК только одна цепь ДНК обычно используется как матрица.
- В. В клетках бактерий транскрипцию РНК всех классов осуществляет РНК-полимераза одного типа, тогда как в клетках эукариот используются три разных типа РНК-полимераз.

¹ МБК — основная книга «Молекулярная биология клетки».

- Г. Модифицированные нуклеотиды, особенно часто встречающиеся в молекулах тРНК, образуются в результате ковалентной модификации стандартных нуклеотидов перед их включением в РНК-транскрипты.
- Д. Если в антикодоне тРНК^{Tyr} заменить одно основание, так чтобы он узнавал сериновый кодон, а затем добавить его в бесклеточную систему, то синтезированный белок должен содержать тирозин во всех положениях, обычно занимаемых серином.
- Е. Каждый комплекс аминокислоты с тРНК активирован не для его присоединения, а для присоединения очередной аминокислоты к растущей полипептидной цепи.
- Ж. Согласно гипотезе неоднозначного соответствия, спаривание оснований происходит путем образования связи между основанием в первом положении кодона и основанием в третьем положении антикодона.
- 3. Главная функция малой субчастицы рибосомы – связывание мРНК и различных тРНК; большая субчастица рибосомы катализирует образование пептидной связи.
- И. На синтез белков, при котором для присоединения одной аминокислоты требуются четыре макроэргические фосфатные связи (4 на кодон), идет в целом меньше энергии, чем на транскрипцию ДНК с образованием РНК, при которой на один добавляемый к полинуклеотидной последовательности нуклеотид тратится свободная энергия двух макроэргических фосфатных связей (6 на кодон).
- К. Поскольку стартовым кодоном для начала синтеза белка является AUG, то метионин обнаруживается только на N-концах полипептидных цепей белков.
- Л. Некоторая задержка между связыванием нагруженной тРНК с рибосомой и последующим использованием аминокислоты в синтезе белка повышает точность последнего, давая возможность тРНК с неправильно спаренными основаниями отделиться от рибосомы.
- М. Многие антибиотики, используемые в современной медицине, избирательно подавляют синтез белка только у бактерий благодаря структурным и функциональным различиям между рибосомами прокариот и эукариот.

5-3 Одна цепь участка ДНК, выделенной из *E. coli*, имеет следующую последовательность оснований:

5' GTAGCCTACCCATAGG 3'.

- А. Допустим, что с этой ДНК транскрибируется мРНК, причем матрицей служит комплементарная цепь. Какова будет последовательность мРНК?
- Б. Какой пептид будет синтезироваться, если трансляция начинается точно с 5'-конца этой мРНК? (Предположите, что не требуется никакого стартового кодона, как это и происходит при определенных условиях опытов в пробирке.) Когда от рибосомы отделяется тРНК^{Ala}, какая тРНК связывается следующей? Когда аминокислота аланина образует пептидную связь, какие связи разрываются, и разрываются ли вообще, и что происходит с тРНК^{Ala}?
- В. Сколько пептидов кодирует эта мРНК? Будут ли синтезироваться такие же пептиды, если матрицей для трансляции будет служить другая цепь ДНК?
- Г. Предположите, что эта последовательность ДНК транскрибируется, как указано в пункте А, но вам неизвестно, какая рамка считывания используется. Может ли этот участок ДНК относиться к началу гена, к его середине, к его концу?

РНК
Tetra
Цито
Tetra
мРНК

Рис. 5-
в при
разных
(задача

- 5-4 От С-конца молекулы фермента бета-лактамазы из *B. licheniformis* после того, как он синтезируется, отделяется несколько аминокислот. Последовательность на С-конце этого фермента можно установить путем сравнения его с ферментом мутанта, у которого происходит сдвиг рамки считывания в результате вставки или делеции одного нуклеотида. Аминокислотные последовательности очищенного фермента из клеток дикого типа и из клеток мутанта со сдвигом рамки представлены ниже, начиная с 263-го остатка до С-конца:

дикий тип: N M N G K,

мутант: N M I W Q I C V M K D.

- А. В чем заключалась мутация, приведшая к сдвигу рамки?
Б. Определите количество аминокислот в новосинтезированном ферменте из клеток дикого типа и, насколько возможно, реальную последовательность для этого фермента.

- 5-5 Вы изучаете особенности синтеза белка у одноклеточной инфузории *Tetrahymena*. При этом у вас есть как успехи, так и неудачи.

Успехи — это получение первых данных о последовательностях белка и нуклеиновой кислоты для С-конца одного из белков *Tetrahymena*:

I M Y K Q V A Q T Q L *
AUU AUG UAU AAG UAG GUC GCA UAA ACA CAA UUA UGA GAC UUA

Неудачи состоят в том, что вам не удастся провести трансляцию очищенной мРНК *Tetrahymena* в лизате ретикулоцитов, который служит стандартной системой для анализа синтеза белка *in vitro*. Эту мРНК можно было считать хорошей по всем критериям, но продуктами ее трансляции были в основном мелкие полипептиды (рис. 5-1, дорожка 1).

Чтобы разобраться в причинах неудач, вы ставите несколько контрольных опытов с очищенной мРНК вируса табачной мозаики (ВТМ), которая кодирует белок с мол. массой 116 кДа. Эта мРНК хорошо транслируется в системе *in vitro*; при этом образуется белок с мол. массой 116 кДа — ожидаемый продукт, который на электрофореграмме дает основную полосу, — и белок с массой на 50 кДа больше, который дает очень слабую полосу (дорожка 2). При добавлении РНК *Tetrahymena* отмечается значительное возрастание количества продукта с более высокой мол. массой (дорожка 3). Когда вы добавляете в систему некоторое количество цитоплазмы *Tetrahymena* (без рибосом), мРНК ВТМ дает почти исключительно продукт с большей мол. массой (дорожка 4); кроме того, к вашему удовольствию, ранее неактивная мРНК *Tetrahymena*, по-видимому, начинает транслироваться (дорожка 4). Вы убеждаетесь в этом, исключая из системы мРНК ВТМ (дорожка 5).

- А. Чем необычна кодирующая последовательность для белка *Tetrahymena*?
Б. Как, по вашему мнению, образуется минорный продукт с большей мол. массой за счет мРНК ВТМ в лизате ретикулоцитов?
В. Объясните, почему изменяется соотношение между количествами основного и минорного белков ВТМ при добавлении только РНК *Tetrahymena* и этой РНК вместе с цитоплазмой *Tetrahymena*. Какие компоненты *Tetrahymena* вероятнее всего необходимы для эффективной трансляции мРНК *Tetrahymena*?
Г. Объясните значение результатов ваших экспериментов с эволюционной точки зрения.

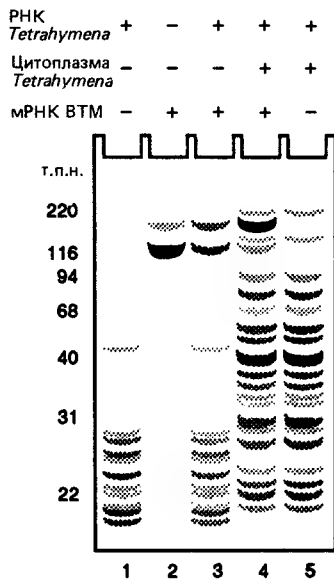
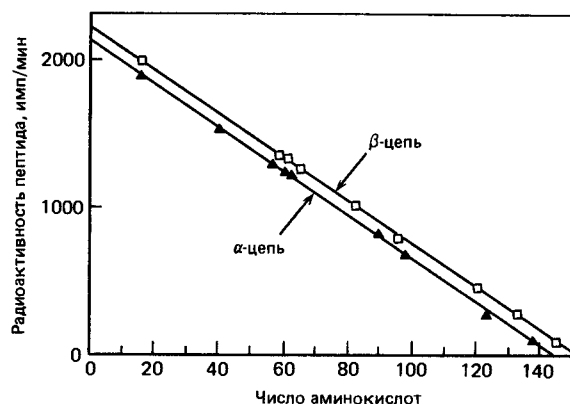


Рис. 5-1. Трансляция мРНК ВТМ в присутствии и в отсутствие разных компонентов *Tetrahymena* (задача 5-5).

Рис. 5-2. Синтез α - и β -глобина (задача 5-6).



5-6 Проанализируем эксперимент по изучению координированного синтеза α - и β -цепей гемоглобина. Ретикулоциты кролика подвергали мечению ^3H -лизином в течение 10 мин, т.е. достаточно долго по сравнению с продолжительностью синтеза единичной цепи гемоглобина. Затем с помощью центрифугирования выделяли рибосомы с прикрепленными к ним растущими полипептидными цепочками, так чтобы в полученном препарате не было свободных (растворенных) цепочек полностью синтезированного глобина. Растущие цепочки обрабатывали трипсином, в результате чего получались пептиды с лизином или аргинином на С-конце. Эти пептиды затем разделяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и определяли их радиоактивность. График уровня радиоактивности для каждого пептида в зависимости от положения остатков лизина в цепи представлен на рис. 5-2.

- Позволяют ли такие данные сделать заключение о том, какой конец цепей глобина синтезируется первым? Каким образом?
- В каком соотношении синтезируются α - и β -цепи глобина? Можно ли по этим данным оценить относительное количество молекул мРНК для α - и β -глобина?
- Как долго белковая цепь остается прикрепленной к рибосоме после того, как трансляция достигает кодона терминации?
- Ранее предполагалось, что гем присоединяется к растущим глобиновым цепям во время их синтеза и что синтез полипептидной цепи на рибосоме приостанавливается на время присоединения к ней гемовой группы. Прямые линии на рис. 5-2 указывают на то, что синтез на рибосомах протекает без заметных пауз, и теперь считают, что гем прикрепляется к уже готовой цепи. Выберите из графиков на рис. 5-3 один, который указывал бы на значительную остановку рибосомы где-то в середине ее движения по мРНК.



Рис. 5-3. Гипотетические кривые синтеза глобина при блокировании движения рибосом на середине молекулы мРНК (задача 5-6).

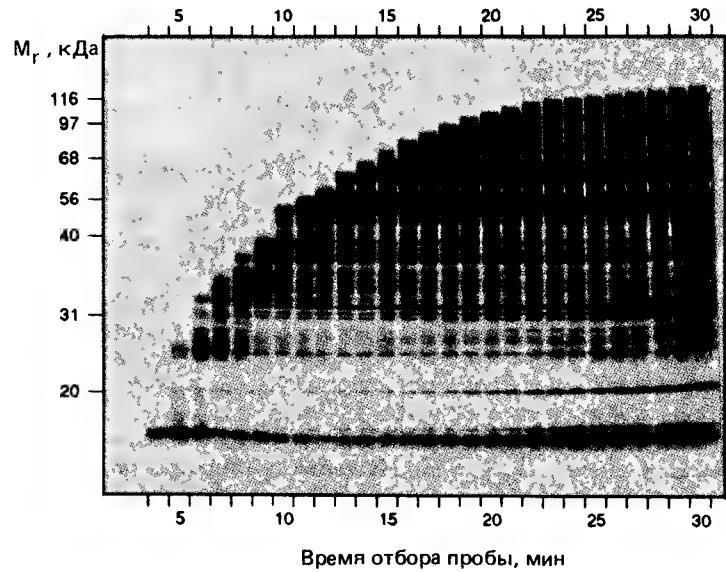
Рис.
ВТМ
лика
мин
деля
ды в
геля

Молекулярная масса

Молекулярная масса

Рис.
теоре
резул
(зада

Рис. 5-4. Динамика синтеза белка ВТМ в лизате ретикулоцитов кролика (задача 5-7). В первые три минуты радиоактивность не определяли, поскольку короткие пептиды выходили за пределы столбика геля.



5-7 Скорость роста пептидных цепей можно оценить по данным, представленным на рис. 5-4. В этом опыте единственный вид мРНК ВТМ, кодирующей белок массой 116000 Да, транслировался в лизате ретикулоцитов кролика в присутствии ^{35}S -метионина. Пробы отбирали с интервалами в одну минуту и анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Продукты трансляции определяли с помощью радиоавтографии. Как следует из рисунка, размер наиболее крупных пептидов увеличивается с продолжением периода трансляции.

- А. Линейна ли скорость синтеза во времени? Простой способ оценки линейности скорости синтеза в этом опыте заключается в том, чтобы мол. массы стандартных пептидов, отмеченные по оси ординат на рис. 5-4, отложить на графике против моментов времени, когда в пробе синтезировались наиболее крупные пептиды, равные им по массе.
- Б. Какова скорость синтеза белка (число аминокислот/мин) в этом эксперименте? Исходите из того, что средняя мол. масса аминокислоты равна 110.
- В. Почему на радиоавтограмме так много полос и количество их продолжает возрастать с продолжением периода трансляции, т.е. почему на практике получается такой «действительный» результат, а не «теоретический», изображенный на рис. 5-5? Можете ли вы придумать такие экспериментальные условия, которые привели бы к получению «теоретической» кривой?

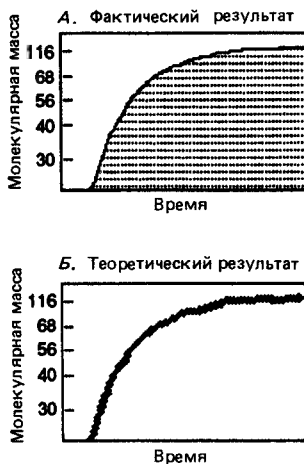
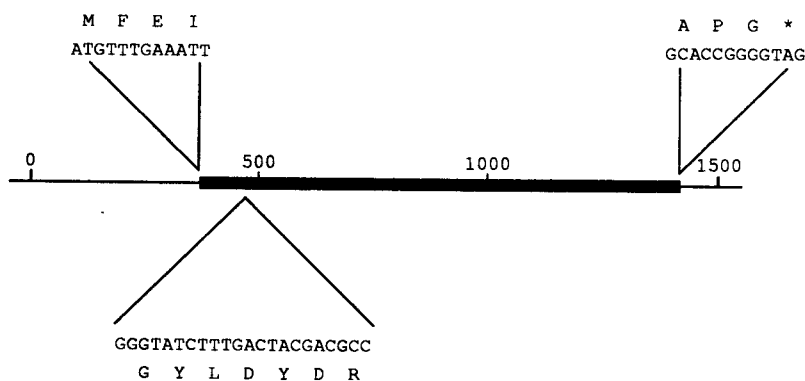


Рис. 5-5. Фактические (А) и теоретически предсказанные (Б) результаты опыта по синтезу белка (задача 5-7).

5-8 Кодоны терминации у бактерий узнаются одним из двух белков: фактор 1 (RF1) узнает UAG и UAA, фактор 2 (RF2) — UGA и UAA. Молекулярные механизмы узнавания этими белками стоп-кодонов и окончания синтеза полипептидной цепи пока неизвестны. В то же время недавно были клонированы и секвенированы гены для факторов 1 и 2. При сопоставлении нуклеотидной последовательности гена для RF2 с аминокислотной последовательностью этого белка был обнаружен неожиданный результат, относящийся к последовательностям, приведенным под картой гена на рис. 5-6. Последовательности этого гена и белка были тщательно проверены, чтобы исключить возможность каких-либо ошибок.

Рис. 5-6. Схематическое изображение гена для белка RF2 (задача 5-8). Кодированная последовательность изображена жирной линией; приведены последовательности нуклеотидов на ее концевых участках.



- А. В чем состояла неожиданность результата?
 Б. На какое предположение относительно регуляции экспрессии гена белка RF2 наталкивают эти данные?

5-9 Измерить общую точность белкового синтеза чрезвычайно трудно. Это объясняется отчасти тем, что его точность очень высока и, следовательно, ошибки крайне редки, а также тем, что клетки обычно быстро ликвидируют допущенные ошибки. Существуют и технические проблемы. Например, насколько точно можно идентифицировать какой-либо белок, безусловно отличающийся от белка, для которого вам известны условия очистки и критерии идентификации?

Один остроумный подход к этой проблеме основан на использовании белка флагеллина (мол. масса 40 000), который заведомо является единственным белком бактериальных жгутиков. Флагеллин обладает двумя достоинствами. Во-первых, жгутик (а следовательно, и флагеллин) может быть отделен от клеток бактерий и очищен с помощью дифференциального центрифугирования. Во-вторых, в этом белке нет цистеина, что позволяет с высокой точностью определить ошибочное включение цистеина в белок.

Бактерии метили $^{35}\text{SO}_4$ [уд. активность $5,0 \times 10^3$ имп/(мин $\times$ пмоль)] в пределах точно одной генерации и при избытке немеченого метионина (в этих условиях отсутствует какое-либо включение радиоактивности в метионин). Образованный в результате флагеллин был очищен и подвергнут электрофорезу в полиакриламидном геле. В 8 мкг флагеллина, выделенного из геля, содержалось 300 имп/мин ^{35}S -радиоактивности.

- А. Какая доля молекул флагеллина, синтезированных в период мечения, содержит цистеин? Считайте, что количество флагеллина удваивается за период мечения и что удельная активность цистеина во флагеллине равна удельной активности $^{35}\text{SO}_4$, используемой для мечения клеток.
 Б. Во флагеллине цистеин ошибочно включается по аргининовым кодонам CGU и CGC. Объясните на основе взаимодействия кодон-антикодон, какая ошибка совершается при неправильном включении цистеина вместо аргинина?
 В. Если считать, что во флагеллине содержится 18 молекул аргинина и что все кодоны аргинина равноправны, то какова частота ошибочного считывания каждого чувствительного кодона аргинина (CGU и CGC)?
 Г. Предполагая, что частота ошибки в расчете на один кодон, рассчитанная в пункте В, одинаково приложима к кодомам всех



Рис. 5-7. Действие ингибиторов эдеина и циклогексимида на синтез белка в лизатах ретикулоцитов (задача 5-10).

аминокислот, определите долю молекул, которые синтезируются правильно, для белков длиной в 100, 1000 и 10 000 аминокислот. (Вероятность безошибочного кодирования равна единице минус вероятность ошибки.)

5-10 Вы выделили из культуры бактерий антибиотик эдеин. Он ингибирует синтез белка, но не затрагивает ни синтеза ДНК, ни синтеза РНК. При добавлении эдеина к лизату ретикулоцитов синтез белка прекращается спустя некоторое время, как показано на рис. 5-7. В отличие от этого циклогексимид останавливает синтез белка сразу после добавления. Анализ лизата после ингибирования эдеином, проведенный методом центрифугирования в градиенте плотности сахарозы, показал, что после остановки синтеза белка в лизате не оставалось полирибосом. Вместо них вся мРНК глобина накапливалась в аномальном пике 40S, содержащем также эквивалентные количества малых субъединиц рибосом и инициаторную тРНК.

- А. Какой этап в синтезе белка ингибирует эдеин?
- Б. Почему синтез белка прекращается не сразу после добавления эдеина?
От чего зависит длительность этой задержки?
- В. Следует ли ожидать исчезновения полирибосом, если вы добавите одновременно с эдеином циклогексимид?

Механизмы репарации ДНК (МБК 5.2)

5-11 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Большая часть спонтанных изменений в ДНК быстро ликвидируется за счет процесса исправления, называемого _____; лишь изредка механизм поддержания постоянства структуры ДНК не срабатывает, и появившееся в последовательности нуклеотидов изменение сохраняется; оно называется _____.
- Б. Для генов, которые кодируют _____, участвующие в свертывании крови, характерно накопление мутаций, не подвергающихся давлению отбора.
- В. Два наиболее распространенных изменения в ДНК — это _____, возникающая в результате разрыва N-гликозидных связей аденина или гуанина с дезоксирибозой, и _____, при котором цитозин превращается в урацил.
- Г. Репарация ДНК включает три этапа: узнавание и удаление измененной части цепи ДНК ферментами, называемыми _____; последующий ресинтез удаленного участка ферментом _____ и сшивание разрыва, оставшегося в цепи ДНК, ферментом _____.
- Д. Нехватка основания, обычно соединенного с дезоксирибозой в молекуле ДНК, быстро распознается ферментом _____, которая разрезает фосфодиэфирный остов цепи ДНК в измененном участке.
- Е. Каждая _____ узнает в ДНК измененные основания определенного типа и катализирует их гидролитическое отщепление от сахара дезоксирибозы.
- Ж. Те повреждения ДНК, которые создают искажения в ее спиральной структуре, удаляются с помощью механизма репарации _____.

3. У *E. coli* любая остановка репликации, вызванная повреждением

ДНК, служит сигналом для _____, позволяющего преодолеть блок репликации и тем самым дающего клетке шанс на выживание.

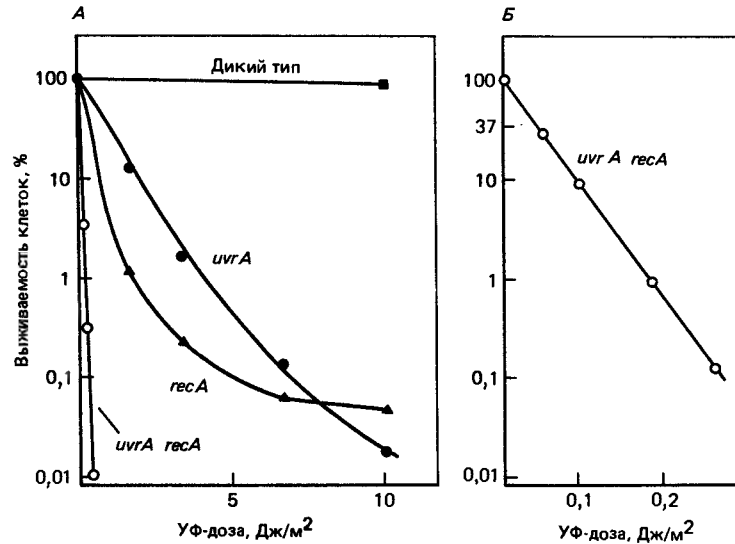
5-12 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие – нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- ___ А. Фибринопептиды, которые отделяются от фибриногена при его активации и образовании фибрина во время свертывания крови, особенно полезны для оценки частоты мутаций, потому что они, по-видимому, не связаны непосредственно с какой-либо жизненно важной функцией.
- ___ Б. Оценки частоты мутаций, основанные на различиях в аминокислотном составе между одними и теми же белками у разных видов, всегда будут заниженными, поскольку некоторые мутации могут существенно затрагивать функцию белка и исключаться из популяции под давлением отбора.
- ___ В. Поскольку гистоны H4 фактически идентичны у всех видов, то следует ожидать, что и гены гистонов H4 у разных видов тоже идентичны.
- ___ Г. Наблюдаемые скорости мутирования, хотя они и очень низки, тем не менее определяют число незаменимых генов: в любом организме оно составляет приблизительно 60 000.
- ___ Д. Существуют разнообразные механизмы репарации, но все они зависят от наличия двух копий генетического материала, по одной в каждой хромосоме диплоидного организма.
- ___ Е. Как при спонтанной апуринизации, так и при удалении дезаминированного цитозина урацил-специфической гликозилазой ДНК образуется один и тот же промежуточный продукт, служащий субстратом для АП-эндонуклеазы.
- ___ Ж. Только начальный этап репарации ДНК катализируется уникальными для процесса репарации ферментами; последующие ее этапы катализируются ферментами, выполняющими более общие функции в метаболизме ДНК.
- ___ З. Основное назначение экстренного SOS-ответа у *E. coli* – повысить выживаемость клеток за счет внедрения компенсирующих мутаций вблизи участка первоначального повреждения ДНК.
- ___ И. Все продукты спонтанного дезаминирования четырех обычных оснований ДНК узнаются как неестественные, когда они возникают в ДНК.

5-13 Несколько генов у *E. coli*, таких, как *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* и *recA*, участвуют в репарации повреждений ДНК, вызванных ультрафиолетовым облучением. Штаммы *E. coli*, имеющие дефект по любому из этих генов, гораздо более чувствительны к летальному действию ультрафиолета, чем штамм дикого типа, как показано для штаммов *uvrA* и *recA* на рис. 5-8, А. Отдельные мутации в разных генах могут комбинироваться попарно, приводя к появлению всевозможных двойных мутантов. Чувствительность двойных мутантов варьирует гораздо шире, чем чувствительность мутантов по одному гену. Комбинации из двух *uvr*-мутаций дают лишь слабое увеличение чувствительности по сравнению с любой единичной *uvr*-мутацией. В то же время комбинация *recA*-мутации с любой из *uvr*-мутаций дает штамм, который особо чувствителен к УФ-свету, как показано для *uvrArecA*-мутанта на графике с растянутой шкалой (рис. 5-8, Б).

- А. Почему сочетание *recA*-мутации с *uvr*-мутацией дает чрезвычайно чувствительный к УФ-свету штамм бактерий, тогда как при

Рис. 5-8. Выживаемость клеток (%) как функция дозы ультрафиолетового облучения (задача 5-13). А. Выживаемость клеток дикого типа, *uvrA*-мутанта, *recA*-мутанта и двойного мутанта *uvrArecA*. Б. Кривая выживаемости мутанта *uvrArecA* при растянутой шкале по оси абсцисс.



комбинировании мутаций в разных *uvr*-генах чувствительность возрастает не больше, чем при единичных мутациях?

- Б. Согласно распределению Пуассона, в популяции бактерий, получившей в среднем один летальный «удар», 37% (e^{-1}) клеток выживет, потому что по ним этот удар не придется. В случае двойного мутанта *uvrArecA* при дозе 0,04 Дж/м² выживаемость составляет 37% (рис. 5-8, Б). Рассчитайте, сколько пиримидиновых димеров образуется при одном летальном ударе в случае штамма *uvrArecA*, считая, что размер генома *E. coli* равен 4×10^6 п.н., из которых на долю GC приходится 50%, и что облучение ДНК ультрафиолетом в дозе 400 Дж/м² приводит к превращению 1% всех пиримидиновых пар (ТТ, ТС, СТ плюс СС) в пиримидиновые димеры.

5-14 Кроме летального действия УФ-свет оказывает также мутагенный эффект. Предположим, что вы измерили частоту мутаций, индуцированных ультрафиолетом, у штамма *E. coli* дикого типа и у штамма с дефектами либо по гену *uvrA*, либо по гену *recA*. Результаты приведены в табл. 5-1. Неожиданно эти штаммы оказались заметно различающимися по своей мутабельности под действием УФ-света.

- А. Предполагая, что продукты генов *recA* и *uvrA* участвуют в различных механизмах репарации повреждений, вызванных ультрафиолетом, ответьте, какой путь более предрасположен к ошибкам? Какой механизм преобладает в клетках дикого типа?

Таблица 5-1. Частота УФ-индуцированных мутаций у разных штаммов *E. coli* (задача 5-14)

Штамм	Выживаемость, %	Число мутаций/ 10^{10} выживших клеток
Дикий тип	100	400
<i>recA</i>	10	1
<i>uvrA</i>	10	40 000

Б. Путь, подверженный ошибкам, связан, по-видимому, с неправильным включением нуклеотидов против участка с неисправленным повреждением. При необходимости ДНК-полимеразы включают против участка с неясными кодирующими свойствами, например против пиримидиновых димеров, адениловые нуклеотиды. Представляет ли собой это так называемое «правило А» хорошую стратегию для борьбы с УФ-повреждениями ДНК? Рассчитайте частоту изменений в основаниях (мутации) при действии этого правила и при случайном включении (каждый нуклеотид с равной вероятностью) для *E. coli*, у которой пиримидиновыми димерами являются приблизительно 60% ТТ, 30% ТС и СТ и 10% СС.

5-15 SOS-ответ у *E. coli* представляет собой экстренную реакцию на повреждение ДНК. Как видно из рис. 5-9, при нормальных условиях SOS-набор генов, индуцируемых повреждением, выключен репрессором *lexA*, который частично подавляет также свой собственный синтез и синтез *recA*. В ответ на повреждение ДНК некий сигнал (по-видимому, это одноцепочечная ДНК) активирует *recA*, который затем вызывает расщепление *lexA*. В отсутствие *lexA* все гены экспрессируются максимально. SOS-ответ повышает выживаемость клеток в условиях повреждения ДНК, временно увеличивает скорость мутирования и, следовательно, изменчивость в популяции бактерий. Экспрессия SOS-генов необходима в случаях резких повреждений, но их постоянная экспрессия могла бы оказаться очень вредной для клеток.

Один из аспектов регуляции SOS-ответа кажется совершенно парадоксальным: экспрессия *lexA* (репрессора SOS-ответа) существ-

Рис. 5-9. SOS-ответ у *E. coli* (задача 5-15).

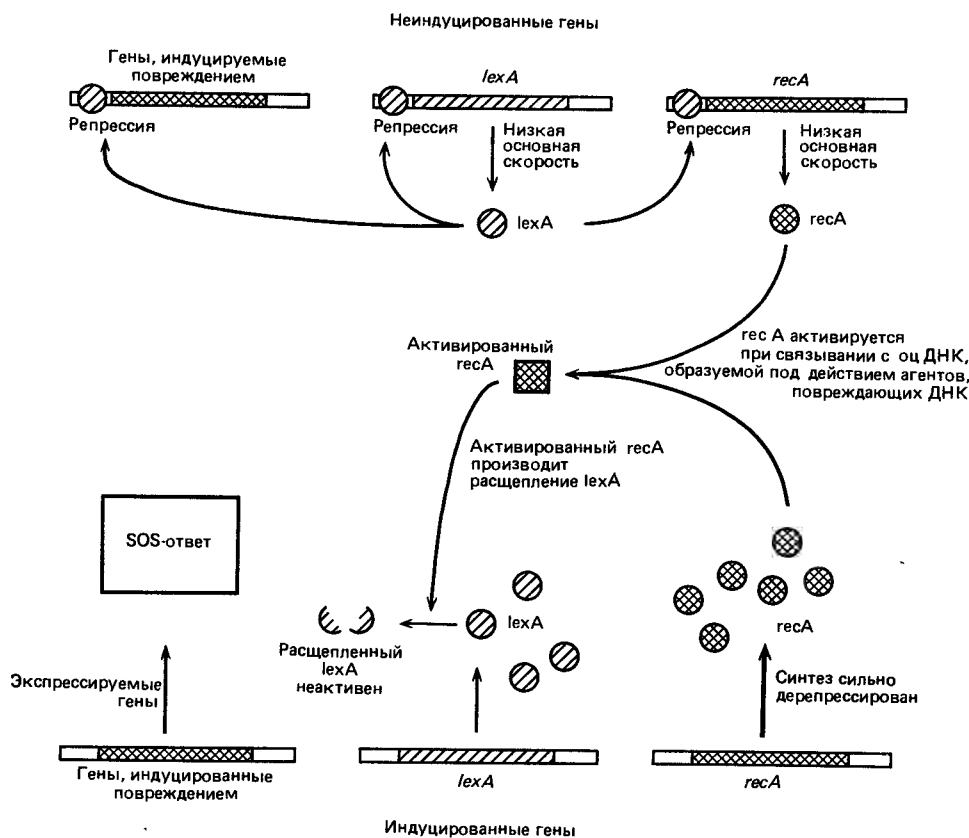
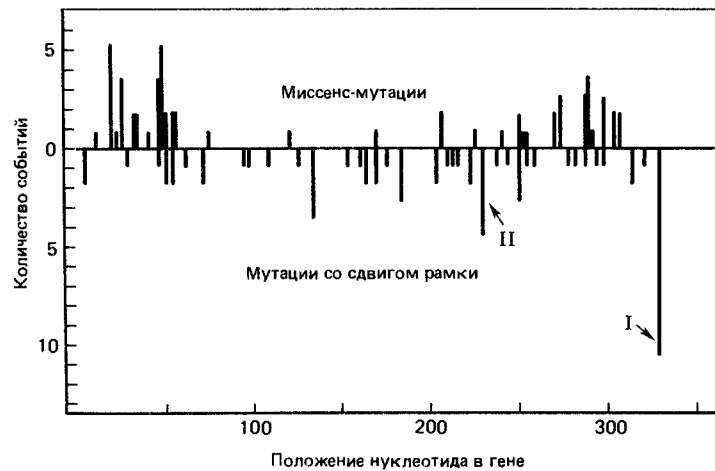


Рис. 5-10. Распределение индуцированных ультрафиолетовым излучением мутаций в гене *lacI* у *E. coli* (задача 5-16).



венно возрастает при SOS-ответе. Если целью последнего является максимальная экспрессия генов, индуцируемых при повреждении ДНК, то как может находиться при этом на высоком уровне и экспрессия репрессора? Другими словами, почему *lexA* не экспрессируется все время с низкой скоростью? Видите ли вы какое-нибудь преимущество в том, что для регуляции SOS-ответа требуется экспрессия *lexA*?

5-16 Варианты индуцированных ультрафиолетом мутаций в гене *lacI* у *E. coli* были подвергнуты тщательному изучению. На рис. 5-10 сверху от линии нуля показано общее число выделенных независимо миссенс-мутаций (несинонимичных замен кодонов аминокислот), а под линией нуля число мутаций со сдвигом рамки (изменение рамки считывания). Количество мутаций обеих категорий почти одинаково. Миссенс-мутации были идентифицированы по критерию утраты функции белка, кодируемого геном *lacI* (*lac*-репрессор); мутации со сдвигом рамки были выявлены с помощью метода слияния генов, которое не зависит от функционирования *lac*-репрессора.

- А. Как вы считаете, в чем причина того, что на концах гена миссенс-мутаций возникает гораздо больше, чем в его середине? Почему мутации со сдвигом рамки распределены по геному более или менее равномерно (за исключением одного или двух «горячих мест»)?
- Б. Анализ последовательности в одном «горячем месте» ДНК (с пометкой I на рис. 5-10) показал, что у дикого типа это было TTTTTC, а у мутанта — TTTTC. Другая наиболее частая мутация (с пометкой II на рис. 5-10) заключается в изменении от GTTTTC к GTTTC. Анализ других мутаций со сдвигом рамки показал, что большинство их связано с потерей одного основания; никаких вставок обнаружено не было. Можете ли вы высказать предположение о молекулярном механизме потери одной пары оснований исходя из того, что вам известно о природе УФ-повреждений ДНК?

5-17 Кроме эндонуклеазной репарации *uvrABC*, рекомбинантной репарации и SOS-репарации у бактерий есть еще более мощная система репарации, предназначенная для ликвидации пиримидиновых димеров (данная система здесь не рассматривается). Этот механизм был открыт в процессе поиска некоего неконтроли-

руемого фактора, играющего роль в действии ультрафиолетового света на бактерии. История открытия похожа на сюжет, описанный ниже.

Представьте, что вы параллельно со своим руководителем пытаетесь выделить мутанты *E. coli*, используя ультрафиолетовое облучение в качестве мутагенного воздействия. Для того чтобы получить много различных мутантов, вы применяете такую дозу облучения, от которой гибнет 99,99% бактерий. Полученные вами результаты гораздо более однозначны, чем те, что получил ваш руководитель, использовавший в 10 и 100 раз более высокие дозы облучения, чтобы достичь такого же уровня гибели бактерий. Руководитель сомневается в ваших результатах из-за того, что вы всегда ставите опыты ночью, после его ухода. Когда по настоянию руководителя вы приходите утром и ставите свои опыты параллельно с ним, у вас обоих неожиданно получаются совершенно одинаковые результаты. Вы немного огорчены, потому что полученные данные ближе к результатам вашего руководителя, а ведь вы самоуверенно полагали, что в экспериментальной работе более искусны, чем ваш наставник, которого к тому же редко видели в лабораторном халате в последнее время. Однако когда вы вместе повторяете эксперименты ночью, то, к удивлению руководителя, результаты оказываются точно такими, как те, что вы получили раньше.

Теперь, когда утвердилось доверие к результатам друг друга, быстро появляется ясность. Оказывается, для достижения одного и того же уровня летального повреждения бактерий в дневное время (в полдень) нужна более высокая доза ультрафиолетового света, чем утром. В солнечные дни требуются более высокие дозы, чем в пасмурные. Окна лаборатории выходят на запад. Попробуйте ответить, какой переменный фактор вносил неясность в ваши эксперименты?

5-18 Такие мутагены, как N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (МННГ) и метилнитрозомочевина (МНМ), являются мощными метилирующими ДНК агентами. Они чрезвычайно токсичны для клеток. Нитрозогуанидины применяются в исследовательской работе в качестве мутагенов, а в клинической практике – как лекарственные средства при химиотерапии рака, поскольку в первую очередь они вызывают гибель клеток, находящихся на стадии репликации.

Оригинальный эксперимент, который привел к открытию алкилирующей системы репарации у бактерий, был задуман так, чтобы определить долговременный эффект применения низких доз МННГ (как при химиотерапии) в сопоставлении с эффектом временного воздействия высоких доз МННГ (применяемых для мутагенеза). Бактерии помещали сначала в среду с низкой концентрацией МННГ (1 мкг/мл) на 1,5 ч, а затем переводили в свежую среду без МННГ. В разные моменты инкубации при низкой концентрации МННГ и после нее пробы из суспензии бактерий подвергали воздействию МННГ в высокой концентрации (100 мкг/мл) в течение 5 мин, а затем проверяли на жизнеспособность и частоту мутаций. На рис. 5-11 хорошо видно, что во время инкубации в среде с низкой концентрацией МННГ количество выживших клеток временно увеличивалось и частота мутаций у выживших бактерий уменьшалась. Как показано на рис. 5-12, этой приспособительной реакции на низкие дозы МННГ не наблюдалось, если в инкубационную среду был добавлен хлорамфеникол (ингибитор синтеза белка).

Рис. 5-11. Адаптационный ответ *E. coli* на низкие дозы мутагена МННГ (задача 5-18). Мутаген в концентрации 1 мкг/мл присутствовал в среде в период от -1,5 до 0 ч. Пробы отбирали в различные моменты инкубации и кратковременно обрабатывали их мутагеном в высокой концентрации (100 мкг/мл), после чего оценивали количество выживших клеток и частоту образования мутантов.

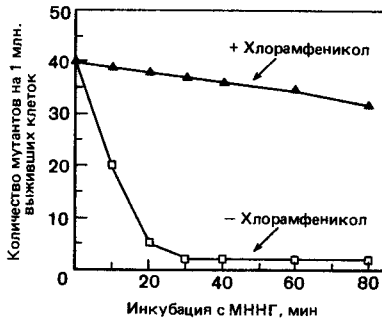
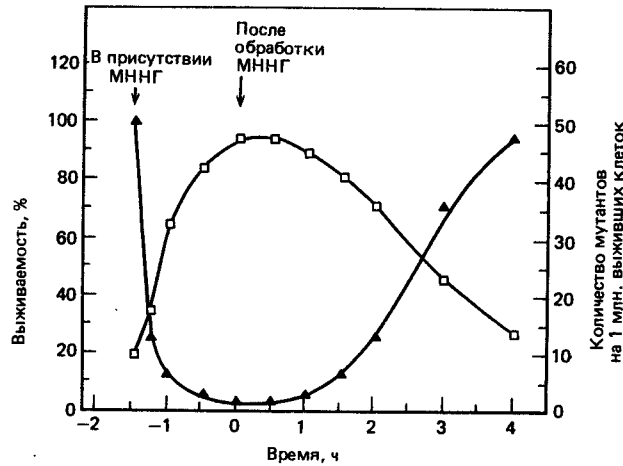
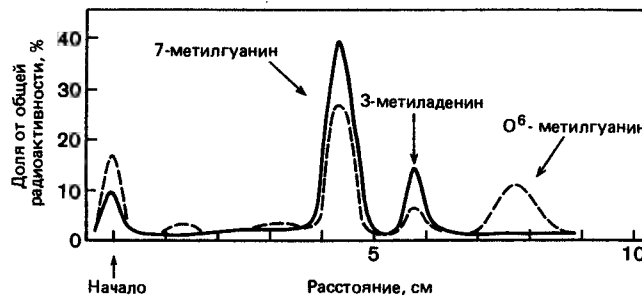


Рис. 5-12. Действие хлорамфеникола на адаптационный ответ при низких дозах мутагена МННГ (задача 5-18). После инкубации бактерий в течение разных периодов времени в присутствии МННГ (1 мкг/мл) отбирали пробы и обрабатывали их мутагеном в концентрации 100 мкг/мл для определения чувствительности к мутагену.

Рис. 5-13. Хроматографическое разделение меченых метилированных пуринов из ДНК необработанных бактерий и из ДНК бактерий, обработанных мутагеном МННГ в низкой концентрации, (задача 5-19). Сплошная линия — спектр метилированных пуринов из ДНК необработанных бактерий; штриховая — спектр метилированных пуринов из ДНК бактерий, обработанных мутагеном.



- А. Связана ли приспособительная реакция *E. coli* на низкие уровни МННГ с активацией уже существующего белка или для нее необходим синтез нового белка?
- Б. Как вы полагаете, почему приспособительная реакция *E. coli* на низкую дозу МННГ является кратковременной?

5-19 Природа мутаций, вызываемых МННГ, а также механизм их удаления из ДНК были определены в следующих экспериментах. Чтобы выяснить характер мутагенного повреждения, интактные, а также обработанные низкими дозами МННГ бактерии инкубировали 10 мин в среде, содержащей меченый мутаген — ^3H -МННГ, — в концентрации 50 мкг/мл. Затем из бактерий выделяли ДНК, гидролизовали ее до нуклеотидов и определяли радиоактивные пурины с помощью хроматографии на бумаге, как показано на рис. 5-13.

Чтобы выяснить механизм ликвидации мутагенного повреждения, был сначала выделен и очищен фермент, ответственный за удаление места повреждения. Кинетику репарации изучали путем инкубации различных количеств фермента (мол. масса 19 000) с ДНК, содержащей 0,26 пмоль мутагенного основания, меченного тритием. В разные моменты инкубации отбирали пробы и анализировали в них ДНК на остаточное содержание мутагенного основания (рис. 5-14). Когда опыт повторили при 5°C вместо 37°C , начальные скорости репарации были более низкими, а конечные теми же самыми.

- А. Какой метилированный пурин ответствен за мутагенное действие МННГ?

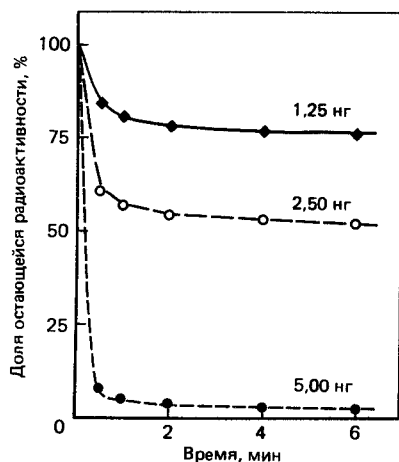


Рис. 5-14. Удаление меченных три-метильных групп из ДНК с помощью очищенного фермента метилтрансферазы (задача 5-19). Количество очищенного фермента указано над каждой кривой.

Б. В чем состоит особенность кинетики удаления метильной группы из мутагенного основания? Связана ли эта особенность с нестабильностью фермента?

В. Рассчитайте число метильных групп, удаляемых каждой молекулой фермента. Поможет ли этот расчет объяснить особенность кинетики?

Механизмы репликации ДНК (МБК 5.3)

5-20 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Фермент, ответственный за синтез ДНК как при репликации, так и при репарации, называется _____.
- Б. Активный участок хромосомы, участвующий в репликации, представляет собой Y-образную структуру, называемую _____.
- В. У *E. coli* новосинтезированная ДНК временно обнаруживается в молекулах длиной 1000–2000 нуклеотидов, называемых _____.
- Г. Фермент, который сшивает разрывы в ДНК во время синтеза ДНК или ее репарации, называется _____.
- Д. Та дочерняя цепь ДНК, которая при репликации синтезируется непрерывно, называется _____, а та цепь, которая синтезируется с перерывами, _____.
- Е. Для ДНК-полимеразы в отличие от РНК-полимеразы совершенно необходим свободный 3'-ОН-конец _____, спаренной с расплетенной ДНК, чтобы присоединять к нему новые нуклеотиды.
- Ж. Если ДНК-полимераза ошибочно присоединит неправильный нуклеотид к 3'-концу, ее отдельный каталитически активный домен, обладающий (3' → 5')-_____ активностью, удалит неподходящее основание.
- З. Для инициации синтеза ДНК на отстающей цепи нужны короткие праймеры, возникающие благодаря работе фермента _____, которая в качестве субстратов использует рибонуклеозидтрифосфаты.
- И. Расплетание двойной спирали ДНК в зоне репликативной вилки катализируется _____, использующей для направленного движения по ДНК энергию гидролиза АТФ.
- К. Способствующие расплетию ДНК _____ связываются с одноцепочечной ДНК таким образом, что основания становятся доступными для реакции матричного синтеза.
- Л. Если ДНК-полимераза ошибается при образовании пары оснований, соединенных друг с другом водородными связями, то ошибка исправляется специальной системой _____ (репарации повреждений), которая отличает новые цепи от старых по признаку метилирования.
- М. Для бактерий и некоторых вирусов, инфицирующих эукариотические клетки, было показано, что репликационные глазки образуются в тех участках молекулы ДНК, где находятся специальные последовательности, называемые _____.
- Н. _____ можно рассматривать как «обратимые нуклеазы», которые создают либо кратковременный одноцепочечный разрыв (тип I), либо кратковременный двухцепочечный разрыв (тип II).

5-21 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. У *E. coli* репликативная вилка продвигается вперед со скоростью

500 п. н. в секунду, а цепи ДНК перед вилкой вращаются с круговой скоростью почти 3000 об/мин.

- Б. Полуконсервативная репликация означает, что родительские цепи ДНК служат матрицами для синтеза новых, дочерних, цепей ДНК, так что новые двухцепочечные молекулы ДНК оказываются составленными из одной старой и одной новой цепи.
- В. При считывании в том же направлении (от 5'- к 3'-концу) последовательность нуклеотидов новосинтезированной цепи ДНК получается такой же, как в родительской матричной цепи.
- Г. Синтез ДНК в направлении от 5'- к 3'-концу означает, что удлинение цепи происходит за счет присоединения дезоксинуклеозидтрифосфатов к свободной 3'-ОН-группе (с отщеплением пирофосфата).
- Д. Синтез ДНК происходит в направлении от 5'- к 3'-концу на ведущей цепи и в направлении от 3'- к 5'-концу на отстающей цепи.
- Е. Если бы полимеризация ДНК происходила в направлении от 3' → 5', то растущий конец цепи заканчивался бы 5'-трифосфатом или в качестве предшественников должны были бы использоваться 3'-дезоксинуклеозидтрифосфаты.
- Ж. При утрате ДНК-полимеразой *E. coli* (3' → 5')-экзонуклеазной активности должна уменьшиться скорость синтеза ДНК, но не его точность.
- З. Белки, связывающиеся с одноцепочечной ДНК в репликативной вилке, держат две цепи ДНК разделенными, закрывая собой основания и предотвращая тем самым их спаривание друг с другом.
- И. У *E. coli* репаративная система, исправляющая неправильное спаривание оснований и зависящая от их метилирования, может различать родительскую и дочернюю цепи ДНК, когда одна или обе цепи метилированы, но не может этого делать, если обе цепи не метилированы.
- К. У *E. coli* и у вирусов, инфицирующих эукариотические клетки, новые циклы репликации ДНК начинаются со специфического участка, часто содержащего несколько копий короткой последовательности, с которой связывается комплекс белков, участвующих в инициации процесса.
- Л. Для разрыва и сшивки заново цепей ДНК ферментом топоизомеразой I не нужен АТР, потому что энергия фосфодиэфирной связи временно накапливается в ковалентной связи фосфотирозина в активном центре фермента.
- М. В клетках дрожжей, мутантных по топоизомеразе II, ДНК может реплицироваться, но хромосомы не могут разделяться в процессе митоза.

5-22 Фрагмент ДНК, изображенный на рис. 5-15, является двухцепочечным на концах и одноцепочечным в середине. Для верхней цепи указана полярность.

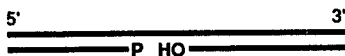


Рис. 5-15. Фрагмент ДНК с одноцепочечным участком, образовавшимся вследствие разрыва в нижней цепи (задача 5-22).

- А. На каком конце фрагмента, 5' или 3', находится указанный на нижней цепи остаток фосфата (P)?
- Б. Каким способом, по вашему мнению, будет заполняться с помощью репаративных внутриклеточных процессов разрыв в цепи ДНК?
- В. Сколько фрагментов будет содержаться в нижней цепи (рис. 5-15), если разрыв в ней заполняется (в условиях реакции в пробирке) при наличии в среде только дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и ДНК-полимеразы?

- Б. Почему отщепление Т-остатков в отсутствие dTTP требует больше времени, чем отщепление С-остатков?
- В. Почему в присутствии dTTP отщепления Т-остатков не происходит, а С-остатки отщепляются независимо от того, есть ли в реакционной смеси dTTP?
- Г. Можно ли ожидать изменения результатов, представленных на рис. 5-18, Б, если добавить dCTP и dTTP?
- 5-25 Где образуется РНК-затравка, на специфических или на случайных участках матрицы? Идеальной матрицей при изучении этого вопроса может служить ДНК вируса М13, потому что она не содержит 3'-ОН-группы.

Для ответа на данный вопрос кольцевую ДНК этого вируса полностью копировали в присутствии ДНК-полимеразы бактериофага Т4, праймосомы Т4 (комплекс геликазы и РНК-праймазы), различных rNTP (рибонуклеозидтрифосфатов) и dNTP (дезоксирибонуклеозидтрифосфатов). Затем двухцепочечные кольцевые продукты обрабатывали рестриктазой, которая расщепляет двойную цепь в специфическом участке. Продукты этого расщепления подвергали денатурации, после чего анализировали последовательность нуклеотидов ДНК методом гель-электрофореза с высоким разрешением. Было обнаружено много отдельных полос. Если продукты расщепления до электрофореза обрабатывали РНКазой, то все они становились на пять нуклеотидов короче, о чем свидетельствовала более быстрая миграция их в секвенирующем геле.

Зная, что каждый продукт рестрикции заканчивается специфическим участком рестрикции, можно было по длине продукта установить матричную последовательность вблизи 5'-конца. (Полная последовательность М13 известна.) Некоторые из этих матричных последовательностей показаны на рис. 5-19 слева. Последовательность ДНК на каждом из соответствующих 5'-концов цепей продуктов была определена после удаления РНК-затравки. Эти последовательности показаны на рис. 5-19, справа, в той же строчке, что и комплементарная последовательность матричной ДНК.

Определите на основе этих данных стартовый участок для РНК-затравки на каждой матричной последовательности. Какой сигнал нужен для начала реакции, катализируемой РНК-праймазой?

- 5-26 Ген *dnaB* у *E. coli* кодирует геликазу, которая участвует в расплетании ДНК на участке репликативной вилки. Свойства этого фермента были изучены с использованием искусственных суб-

Рис. 5-19. Матричные последовательности М13 (слева) и соответствующие последовательности ДНК, образуемые в каждом сайте (справа) во время синтеза РНК-затравки (задача 5-25). РНК-затравки были отделены от этих цепей ДНК перед секвенированием.

Сайт	Матричные последовательности М13		Последовательности ДНК, связанные с РНК-затравкой	
	5'	3'	5'	3'
1	А Т С С Т Т Г С Г Т Т Г А А А Т		А Г Г А Т	
2	Т С Т Т Г Т Т Т Г С Т С С А Г А		С А А Г А	
3	А Т Т С Т С Т Т Г Т Т Т Г С Т С		А Г А А Т	
4	А С А Т Г С Т А Г Т Т Т Т А С Г		С А Т Г Т	
5	А Т Т Г А С А Т Г С Т А Г Т Т Т		Т С А А Т	
6	А Т С Т Т С С Т Г Т Т Т Т Т Г Г		А А Г А Т	
7	А А А Т А Т Т Т Г С Т Т А Т А С		Т А Т Т Т	
8	С Т А Г А А С Г Г Т Т А С С С Т		Т С Т А Г	

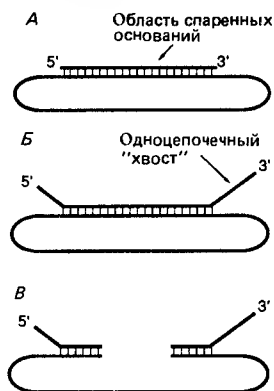


Рис. 5-20. Субстраты, использованные для определения свойств *dnaB* (задача 5-26). *A* – субстрат 1, *B* – субстрат 2, *C* – субстрат 3.

стратов, подобных тем, которые изображены на рис. 5-20. Экспериментальный подход заключался в том, что субстраты инкубировали в разных условиях и затем исследовали образцы методом электрофореза в агарозных гелях. Короткая одиночная цепь будет двигаться медленно, если она еще соединена с длинной цепью ДНК, и будет двигаться гораздо быстрее, если она расплетена и отделена от длинной цепи. Введя в короткую одиночную цепь радиоактивную метку, можно избирательно следить за ее миграцией, определяя ее положение в геле методом радиоавтографии.

Результаты нескольких экспериментов показаны на рис. 5-21. Субстрат 1, представляющий собой гибридную ДНК без «хвостов», не расплетался с помощью *dnaB* (рис. 5-21, дорожки 1 и 2). Однако когда инкубировали субстраты с «хвостами» при $+37^{\circ}\text{C}$ в присутствии *dnaB* и АТР, то за счет расплетания освобождалось значительное количество мелких фрагментов (дорожки 6 и 10). В случае субстрата 3 был раскручен только 3'-полуфрагмент (дорожка 10). Процесс расплетания во всех случаях полностью зависел от гидролиза АТР.

Расплетание существенно увеличивалось при добавлении белка, связывающегося с одноцепочечной ДНК, (SSB-белок) (сравните дорожки 5 и 6 с 9 и 10). Интересно, что этот белок нужно было добавлять приблизительно через 3 мин после *dnaB*, в противном случае он ингибировал расплетание.

- Почему для расплетания нужен гидролиз АТР?
- В каком направлении движется *dnaB* по длинной одноцепочечной ДНК? С чем больше согласуется это направление, с движением по ведущей цепи или по отстающей цепи в репликативной вилке?
- Почему белок, связывающийся с одноцепочечной ДНК (SSB), мог ингибировать расплетание, когда его добавляли до *dnaB*, но стимулировал расплетание, когда его добавляли после *dnaB*?

5-27 В лаборатории, где вы работаете, занимаетесь изучением жизненного цикла вирусов животных. Геном у этих вирусов представлен

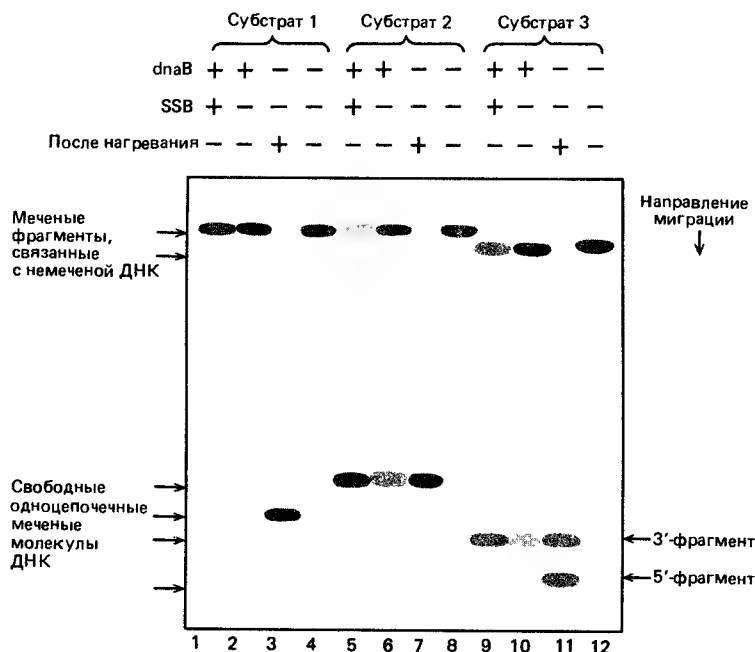


Рис. 5-21. Результаты нескольких экспериментов по измерению расплетания с участием *dnaB* (задача 5-26). Радиоактивная метка содержалась только в одноцепочечных фрагментах, положение которых показано на схеме.

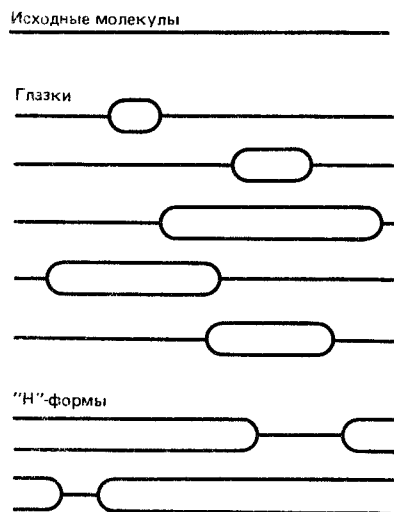


Рис. 5-22. Исходная и репликативные формы вируса животных (задача 5-27).

кольцевой двухцепочечной ДНК. Вам поручено определить положение точки(-ек) начала репликации и выяснить, в одну или в обе стороны от начальной точки протекает репликация (однонаправленный или двунаправленный синтез). Чтобы достигнуть цели, вы выделяете реплицирующиеся молекулы, расщепляете их ферментом рестрикции, который разрезает вирусный геном в определенном сайте (в результате чего из кольцевой молекулы образуется линейная молекула ДНК) и затем исследуете образующиеся молекулы с помощью электронной микроскопии. Некоторые молекулы, которые вы видите, схематически изображены на рис. 5-22. (Обратите внимание, что в электронном микроскопе невозможно отличить один конец молекулы ДНК от другого.)

Вы должны представить свои выводы сотрудникам лаборатории на следующий день. Как вы ответите на вопросы, поставленные перед вами руководителем: 1) имеется ли здесь одна точка начала репликации или таких сайтов несколько; 2) в одном или в двух направлениях происходит репликация?

- 5-28** Условно летальные мутации чрезвычайно полезны для генетического и биохимического анализа такого сложного процесса, как репликация ДНК. Температурочувствительные (*ts*) мутации, являющиеся одной из форм условно летальных мутаций, позволяют организму расти при определенной температуре (например, 30 °C), но препятствуют росту при более высокой температуре (например, 42 °C).

У *E. coli* выделено большое число температурочувствительных мутантов. Все они дефектны по репликации ДНК при 42 °C, но не при 30 °C. Если температура среды повышается с 30 до 42 °C, синтез ДНК прекращается у этих мутантов одним из двух характерных способов. У «быстро останавливающихся» мутантов синтез ДНК прекращается сразу же, а у «медленно останавливающихся» мутантов это происходит только спустя много минут.

- А.** Попробуйте предсказать, мутациями в каких из нижеперечисленных белков, если они температурочувствительные, будет обусловлен «быстро останавливающийся» фенотип, а в каких – «медленно останавливающийся». В каждом случае объясните ваше предсказание.
1. ДНК-топоизомераза I.
 2. Инициаторный белок репликации.
 3. Белок, дестабилизирующий спираль.
 4. ДНК-геликаза.
 5. ДНК-праймаза.
 6. ДНК-лигаза.
- Б.** Характер репликации в бесклеточных экстрактах мутантов по существу не отличается от такового в интактных клетках. В экстрактах «быстро останавливающихся» мутантов при температуре 42 °C синтез ДНК прекращается сразу же, тогда как в случае «медленно останавливающихся» мутантов синтез ДНК продолжается в течение еще нескольких минут после повышения температуры до 42 °C. Предположим, что экстракты из мутанта, дефектного по температурочувствительной ДНК-геликазе, и из мутанта по температурочувствительной ДНК-лигазе были смешаны при 42 °C. Какой фенотип будет показывать смесь: «быстро останавливающийся», «медленно останавливающийся» или немутантный?

Механизмы генетической рекомбинации (МБК 5.4)

5-29 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. При _____ обмен генетическим материалом происходит между гомологичными последовательностями ДНК и наиболее часто между двумя копиями одной и той же хромосомы.
 - Б. В точке обмена цепь одной молекулы ДНК соединяется путем спаривания оснований с цепью второй молекулы ДНК, и между двумя двойными спиралями образуется _____.
 - В. Две одноцепочечные комплементарные молекулы ДНК образуют целую двухцепочечную спираль в результате _____, которая начинается, по-видимому, с медленного этапа _____.
 - Г. У *E. coli* _____ необходим для спаривания хромосом: он связывается с одноцепочечным участком ДНК и способствует его спариванию с гомологичным участком в составе двойной спирали ДНК.
 - Д. Сразу же после возникновения синапса образовавшаяся короткая гетеродуплексная область, где начали спариваться цепи двух разных молекул ДНК, увеличивается за счет _____.
 - Е. Центральным промежуточным этапом в процессе общей рекомбинации является _____ с образованием интермедиата, который называют _____ в честь его первооткрывателя.
 - Ж. Во время рекомбинации между двумя слегка различающимися копиями одного гена (аллелями) один аллель может замещаться другим в процессе, называемом _____.
3. Подвижные последовательности ДНК и некоторые вирусы внедряются в хромосомы-мишени и выходят из них с помощью системы _____ генетической рекомбинации.

5-30 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Общая рекомбинация происходит в том случае, когда имеются протяженные участки с гомологичными последовательностями в спиралях обоих партнеров, а для сайт-специфической рекомбинации требуются лишь короткие специфические нуклеотидные последовательности ДНК, которые иногда могут присутствовать только у одного из обменивающихся партнеров.
- Б. Общая рекомбинация заключается в физическом обмене сегментами ДНК, который связан с разрывом и последующим восстановлением фосфодиэфирных связей в молекулярном остове ДНК.
- В. Белок *гесА* сочетает способность к сайт-специфическому разрезанию одноцепочечных ДНК с АТР-зависимой ДНК-геликазной активностью, которая обеспечивает расплетание одноцепочечных «усов» в дуплексной молекуле ДНК.
- Г. Белок *E. coli*, связывающийся с одноцепочечной ДНК, (SSB-белок) распрямляет короткие, в виде шпильки, спирали в одноцепочечных участках ДНК путем присоединения к их сахарофосфатному остову; в результате этого все основания оказываются «открытыми».
- Д. Белок *recA* связывается одновременно с одноцепочечной ДНК и с двухцепочечной ДНК, катализируя образование синапса между ними.
- Е. В обмене участками между цепями участвуют две различающиеся пары цепей: перекрещенные и неперекрещенные; для превращения их из одного состояния в другое необходимо, чтобы фосфодиэфирная связь была разорвана хотя бы в одной цепи.
- Ж. У грибов за счет процесса конверсии генов иногда происходит изменение пола; в результате спаривания обычно образуется рав-

Рис.
рек

Рис.
ДН
5-3
нос
L и
кон

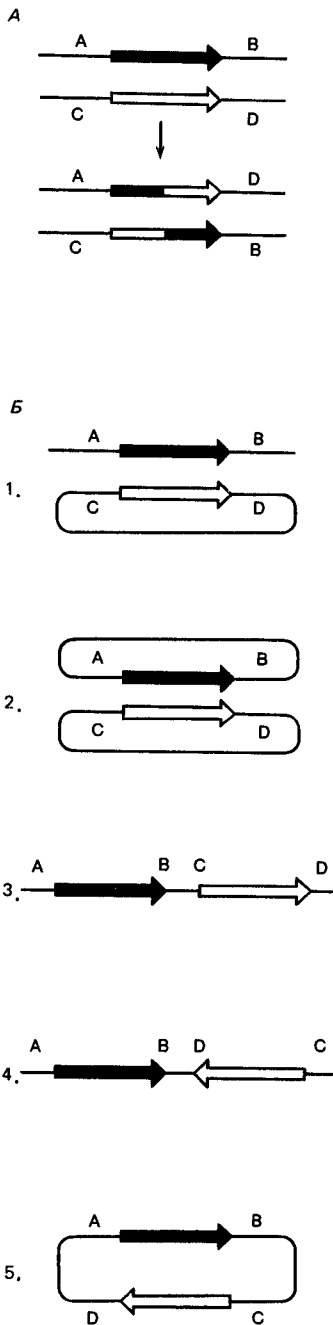


Рис. 5-23. Разнообразие субстратов рекомбинации (задача 5-31).

Рис. 5-24. Фрагмент линейной ДНК, содержащий Хи-сайт, (задача 5-32). Приведена последовательность оснований Хи-сайта. Буквами L и R обозначены левый и правый концы этого фрагмента.

ное число мужских и женских спор, но иногда их соотношение равно 1:3 или 3:1.

3. Все известные механизмы конверсии генов связаны с ограниченным синтезом ДНК.

И. Включение генома фага лямбда в геном *E. coli* катализируется сайт-специфической топоизомеразой (называемой лямбда-интегразой), узнающей короткие специфические последовательности ДНК в обеих хромосомах.

5-31 Пользуясь рис. 5-23, А, изобразите продукты перекрестной рекомбинации между гомологичными участками молекул, изображенных на рис. 5-23, Б. На этом рисунке ДНК-дуплекс изображен тонкой линией, а мишени для гомологичной рекомбинации стрелками.

5-32 Специфические последовательности ДНК, известные как Хи-сайты, локально стимулируют гомологичную рекомбинацию у *E. coli*, происходящую с участием гесBCD. По-видимому, в результате взаимодействия между белком гесBCD и Хи-сайтом стимулируется этап, лимитирующий скорость рекомбинации. Чтобы детально изучить это взаимодействие, белок гесBCD был очищен и проинкубирован с линейными двухцепочечными фрагментами ДНК, содержащими Хи-сайт (рис. 5-24).

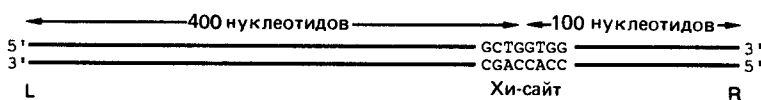
Различные фрагменты линейной ДНК сначала специфически метили на 5'-конце слева (5'L) и на 5'-конце справа (5'R), а также на 3'-конце слева (3'L) и на 3'-конце справа (3'R). Затем препарат каждого фрагмента инкубировали в буфере, содержащем гесBCD-белок. В качестве контроля отдельную пробу меченой ДНК инкубировали в буфере без гесBCD. Инкубация длилась 1 ч. После этого ДНК денатурировали кипячением и образовавшиеся одиночные цепи разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Распределение радиоактивно меченных фрагментов ДНК показано на рис. 5-25. В качестве дополнительного контроля образец 3'R, инкубированный с гесBCD, был подвергнут электрофорезу в геле без предварительной денатурации (рис. 5-25).

А. Какие данные указывают на то, что гесBCD разрезает ДНК в Хи-сайте? Разрезает ли он одну или обе цепи? Если вы решите, что разрезается только одна цепь, определите эту цепь и объясните ваше решение.

Б. Какие данные указывают на то, что гесBCD может действовать как геликаза, т.е. что он может разделять цепи дуплексной ДНК?

В. Каким образом гесBCD мог стимулировать гомологичную рекомбинацию в окрестности Хи-сайта?

5-33 Бактериофаг Т4 кодирует SSB-белок, связывающий одноцепочечную ДНК и играющий важную роль в рекомбинации и репликации ДНК. У мутантов Т4, имеющих температурочувствительную мутацию в гене, кодирующем SSB-белок, рекомбинация и репликация быстро прекращаются при повышении температуры. Синтезируемый SSB-белок — это мономерный белок удлиненной формы с мол. массой 35 000. Он прочно связывается с одноцепочечной ДНК, но не взаимодействует с двухцепочечной ДНК. Связывание насыща-



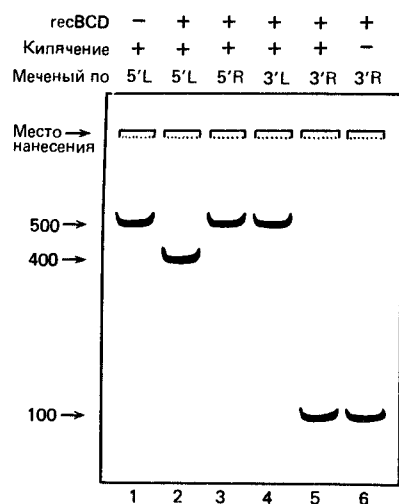


Рис. 5-25. Результаты инкубации гесBCD-белка с содержащими Хи-сайт фрагментами ДНК, в которых были помечены концы определенных цепей (задача 5-32). Числа, относящиеся к полосам, указывают длину меченого фрагмента (в нуклеотидах). Все пробы перед электрофорезом были денатурированы, кроме пробы 6, которую не подвергали кипячению.

ется при весовом соотношении ДНК:белок, равном 1:12. Для этого взаимодействия характерна особенность, которая проиллюстрирована на рис. 5-26. При избытке одноцепочечной ДНК (10 мкг) и количестве SSB-белка 0,5 мкг связывания не наблюдается (рис. 5-26, А), тогда как при количестве SSB-белка 7 мкг происходит почти количественное связывание (рис. 5-26, Б).

- Каково отношение числа нуклеотидов одноцепочечной ДНК к числу молекул SSB-белка при насыщении связывания? (Средняя мол. масса одного нуклеотида равна 330.)
- Контактируют ли соседние мономеры SSB-белка, когда реакция его связывания с ДНК достигает насыщения? Исходите из того, что при связывании мономер SSB-белка тянется на 12 нм вдоль молекулы ДНК и что пространственное расположение оснований в одноцепочечной ДНК после связывания с SSB-белком остается таким же, как и в двухцепочечной ДНК (т.е. 10 нуклеотидов на 3,4 нм).
- Как вы считаете, почему связывание SSB-белка с одноцепочечной ДНК так сильно зависит от количества SSB-белка, как показано на рис. 5-26?

5-34 Белок гесА катализирует как начальный этап рекомбинации — спаривание, так и последующую миграцию ветвей у *E. coli*. Он способствует рекомбинации, связываясь с одноцепочечной ДНК и катализируя спаривание такой покрытой белком цепи с гомологичной двухцепочечной ДНК. Можно определить действие гесА по образованию кольцевых двухцепочечных ДНК в смеси из двухцепочечных линейных молекул ДНК и гомологичных им одноцепочечных кольцевых ДНК, как показано на рис. 5-27. Эта реакция протекает в два этапа: сначала кольцевая ДНК спаривается с линейной молекулой на одном из ее концов, а затем точка ветвления продвигается по линейной двухцепочечной ДНК, пока от нее не отделится линейная одноцепочечная ДНК.

Для понимания процесса с участием гесА важно знать, происходит ли перемещение точки ветвления в строго определенном направлении. Этот вопрос был изучен следующим образом. Одноцепочечные кольцевые молекулы ДНК, равномерно меченные фосфором ^{32}P , смешивали с немечеными двухцепочечными линейными молекулами ДНК в присутствии гесА. Как только одноцепочечная ДНК спаривается с линейной ДНК, она становится чувствительной к действию рестриктаз, которые не разрезают одноцепочечную

Рис. 5-26. Связывание SSB-белка фага Т4 с одноцепочечной ДНК (задача 5-33). Связывание определяли с помощью центрифугирования в градиентах сахарозы, в которых ДНК, имеющая большую массу, оседает быстрее, чем белок, и поэтому обнаруживается ближе ко дну пробирки.

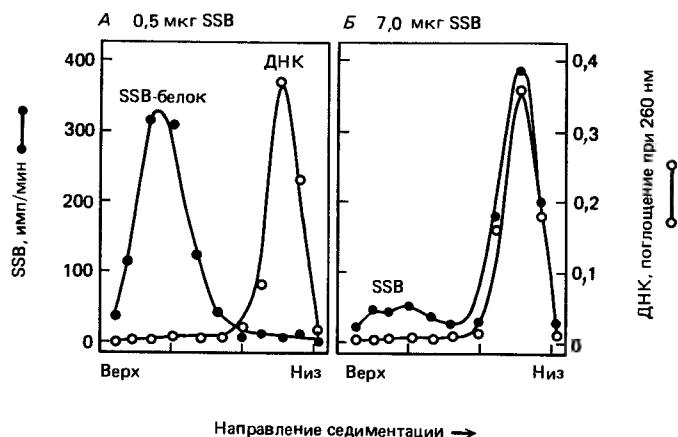


Рис. 5-
цепей
ности
Одно
(+) и
линей
(+)-ц

Рис. 5-
разде
тов ка
с гесА
карта
молекул
к 3'-к

Рис. 5-
бинант

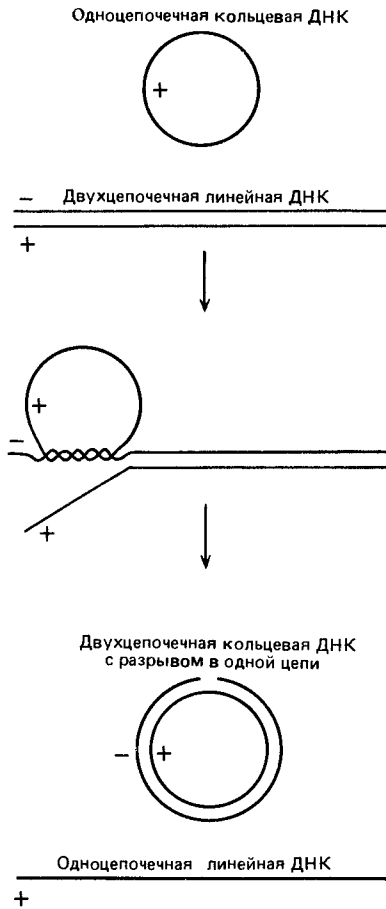


Рис. 5-27. Метод ассимиляции цепей ДНК для определения активности геса-белка (задача 5-34). Одноцепочечная кольцевая ДНК (+) комплементарна (-)-цепи линейного дуплекса и идентична (+)-цепи этого дуплекса.

Рис. 5-28. Электрофоретическое разделение (А) меченых рестрикто-в как функция времени инкубации с геса (задача 5-34). Приведена карта рестрикции (Б) для кольцевой молекулы; направление от 5'-к 3'-концу по часовой стрелке.

ДНК. Отобрав пробы в разные моменты инкубации, обработав их рестриктазами и разделив меченые фрагменты с помощью электрофореза, получили результат, схематично представленный на рис. 5-28.

- Сравнивая время появления меченых фрагментов с картой рестрикции кольцевой ДНК на рис. 5-28, сделайте заключение, какой конец (5' или 3') (-)-цепи линейной ДНК захватывает кольцевая (+)-цепь. Попробуйте также определить направление миграции ветвей вдоль (-)-цепи. (Линейная двухцепочечная ДНК была разрезана по границе между фрагментами а и с, см. карту рестрикции на рис. 5-28, Б.)
- Рассчитайте скорость миграции ветвей, принимая длину этой ДНК равной 7 т. п. н.
- Что произойдет, если линейная двухцепочечная ДНК получит вставку из 500 негомологичных нуклеотидов между рестрикционными фрагментами е и а?

5-35 Два гомологичных родительских дуплекса и два набора потенциально возможных продуктов их рекомбинации схематически изображены на рис. 5-29. Изобразите сформированное родительскими дуплексами соединение Холлидея, которое могло бы давать указанные продукты рекомбинации. Пометьте левый конец каждой цепи в соединении Холлидея как 5' или 3', так чтобы было понятным его соотношение с родительскими и рекомбинантными дуплексами. Ответьте, какие цепи следует разрезать, чтобы получить каждый набор продуктов рекомбинации. Наконец, изобразите графически, как должны выглядеть эти продукты после одного цикла репликации.

5-36 Когда плазмидную ДНК из *E. coli* исследуют с помощью электронного микроскопа, большая часть плазмид имеет вид моно-

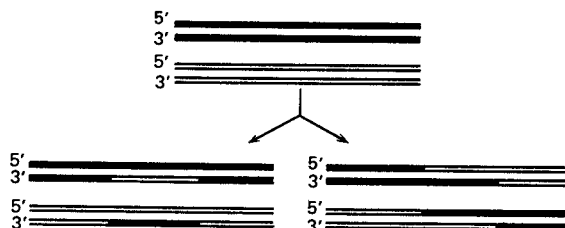
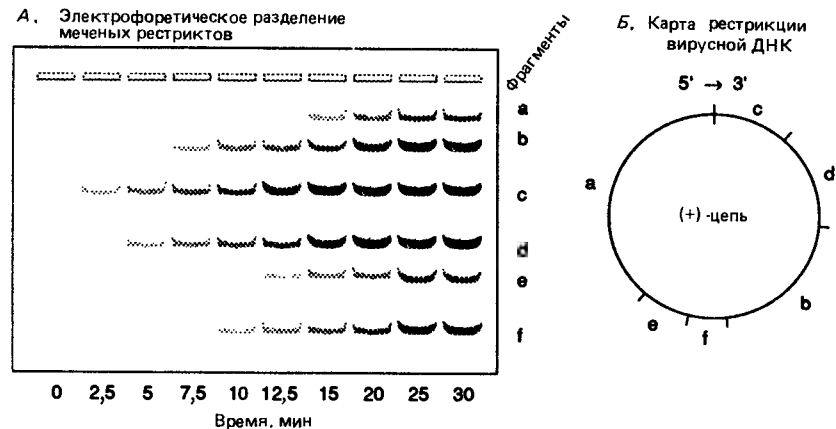
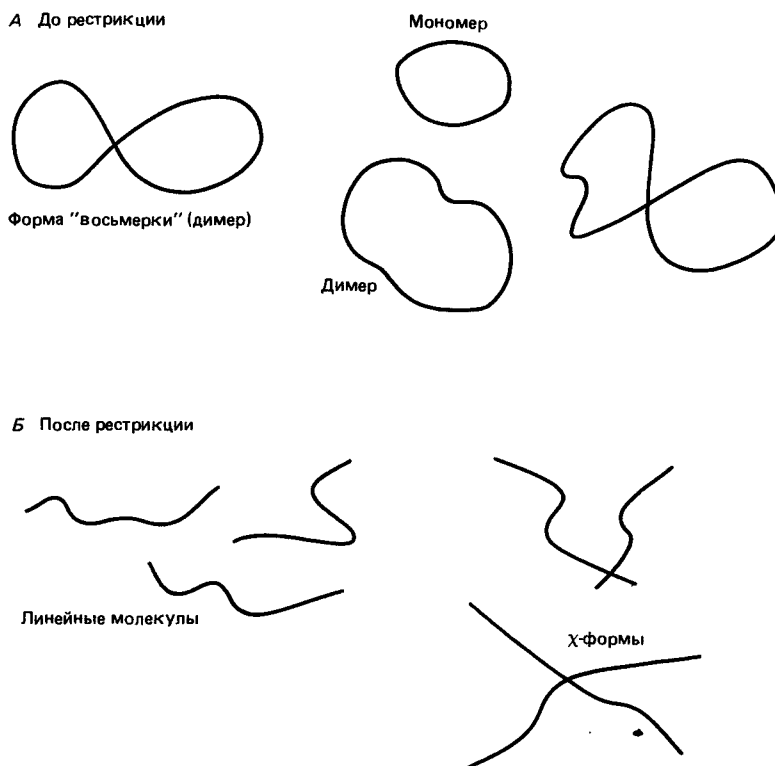


Рис. 5-29. Родительские и рекомбинантные дуплексы (задача 5-35).

Рис. 5-30. Плазмидные молекулы, наблюдавшиеся до обработки рестриктазой, вводящей единичные разрывы, (А) и после такой обработки (Б) (задача 5-36).



мерных колец, но встречаются и другие формы, например димерные и тримерные кольца. К тому же около 1% молекул имеют вид восьмерок, у которых обе петли одинаковы (рис. 5-30, А).

Вы предполагаете, что эти «восьмерки» представляют собой промежуточные продукты рекомбинации с образованием димера из двух мономеров (или двух мономеров из димера). Чтобы выяснить, что это – скрученные димеры или просто соприкасающиеся мономеры, вы обрабатываете препарат ДНК ферментом рестрикции, который разрезает в единственном сайте в мономере, и вновь исследуете молекулы. После рестрикции обнаруживаются только две формы: 99% молекул ДНК имеют форму линейных мономеров и 1% – χ -форму (рис. 5-30, Б). Вы замечаете, что χ -форма обладает примечательным свойством: два длинных плеча имеют одинаковую длину так же, как и два коротких. К тому же сумма длин короткого и длинного плеч равна длине мономерной плазмиды. Однако положение точки перекрещивания совершенно случайное.

Не будучи полностью уверенным в себе и чувствуя, что, по-видимому, допущена какая-то ошибка, вы показываете ваши снимки коллеге. Он считает, что вы видите промежуточные продукты рекомбинации, которые возникают при спаривании случайным образом по гомологичным сайтам.

- А. Прав ли ваш коллега? Каков ход его мыслей?
- Б. Будут ли результаты другими, если повторить те же эксперименты со штаммом *E. coli*, несущим нефункциональный ген *recA*?
- В. Как выглядели бы χ -формы, если бы фигуры типа восьмерки были промежуточными продуктами сайт-специфической рекомбинации между мономерами?

- Г. Как выглядели бы χ -формы, если бы фигуры типа восьмерки были промежуточными продуктами полностью случайной негомологичной рекомбинации между мономерами?

Вирусы, плазмиды и транспозоны (МБК 5.5)

- 5-37 Заполните пропуски в следующих утверждениях.
- А. Вирусы, инфицирующие бактерии, называются _____.
 - Б. Размножение вирусов летально для клетки-хозяина, если для того, чтобы образовавшиеся вирусные частицы вышли наружу, она должна _____.
 - В. Белковая оболочка, окружающая вирусный геном, называется _____.
 - Г. Самый внешний покров у вирусов, _____, — это типичная мембрана, обычно приобретаемая вирусными частицами в процессе отпочковывания от плазматической мембраны.
 - Д. Поскольку в нормальных клетках нет ферментов, которые непосредственно копируют бы РНК на матрице РНК, то вирусы с РНК-геномом должны кодировать _____ или _____, чтобы реплицироваться.
 - Е. Если вирусная РНК выполняет роль непосредственно мРНК, то вирус называется _____; если в роли мРНК выступает РНК, комплементарная вирусной, то вирус называется _____.
 - Ж. _____ бактерии несут в своих хромосомах «дремлющий», но потенциально активный вирусный геном: интегрированный вирусный геном называют _____; этот термин используется также при описании аналогичных вирусных геномов в клетках млекопитающих.
 - З. Вирусы, которые могут встраивать свою ДНК в бактериальные хромосомы, называются _____.
 - И. Животные клетки, в которых не развивается литическая инфекция, вызванная ДНК-содержащими вирусами, называются _____ клетками.
 - К. О животных клетках, которые вследствие вирусной инфекции из нормальных стали раковыми, говорят, что они подверглись _____, вызванной вирусом.
 - Л. Стабильные генетические изменения, вызываемые _____, объясняются активностью фермента _____, который транскрибирует цепи РНК с образованием комплементарных молекул ДНК.
 - М. _____ генома перемещаются с места на место в геноме хозяина, используя свои собственные ферменты сайт-специфической рекомбинации, называемые _____.
 - Н. Элемент *Tu1* в геноме дрожжей служит примером _____, для перемещения которого требуется синтез полного РНК-транскрипта; последний копируется с образованием двуспиральной ДНК и только затем встраивается в новый локус хромосомы.
 - О. Независимо реплицирующиеся элементы, называемые _____, могут реплицироваться произвольно вне хромосомы клетки-хозяина.
 - П. _____, являющиеся возбудителями болезней растений, представляют собой мелкие одноцепочечные кольцевые молекулы РНК, которые не кодируют какой-либо белок.
 - Р. Вирусы захватывают иногда последовательности ДНК в одной клетке-хозяине и переносят их в другую клетку в процессе _____.

_____ ДНК. (Этот процесс не следует путать с трансфекцией ДНК, при которой в клетку вводится свободная ДНК.)

- 5-38** Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.
- А. Поскольку бактериофаг Т4 кодирует по крайней мере 30 разных ферментов, участвующих в репликации и транскрипции генома, то он совершенно не зависит от ДНК- и РНК-полимераз клетки-хозяина, хотя должен, конечно, пользоваться механизмом синтеза белка хозяина.
 - Б. Репликация мелких ДНК-содержащих вирусов, таких, как SV40 и φX174, полностью зависит от механизма репликации клетки-хозяина.
 - В. Вирусы с негативным геномом не содержат генов, кодирующих какие-либо белки.
 - Г. У аденовируса имеются белки, присоединенные ковалентно к 5'-концам его генома; они играют роль затравки для инициации репликации, благодаря чему концы линейного генома полностью реплицируются.
 - Д. Когда бактериофаг лямбда заражает клетку *E. coli*, он обычно вызывает литическую инфекцию, в процессе которой из клетки-хозяина выходит несколько сотен потомков этого вируса; гораздо реже вирус встраивается в хромосому клетки-хозяина, в результате чего образуется лизогенная бактерия, несущая хромосому с провирусом фага лямбда.
 - Е. Заражение ретровирусами часто приводит одновременно к не-летальному для клеток выходу потомства вируса и стабильному генетическому изменению инфицированной клетки, делающему ее раковой.
 - Ж. Вирусы, размножение которых связано с отпочковыванием от клеточных мембран клеток-хозяев, вызывают рак вследствие тех изменений, которые при этом отпочковывании происходят на клеточной поверхности.
 - З. Один из простых способов определить принадлежность вируса к РНК- или ДНК-содержащим вирусам — это выявить его отношение к актиномицину D: если его рост ингибируется этим антибиотиком, который блокирует синтез РНК, зависимый от ДНК, но не затрагивает репликаз, зависящих от РНК, то вирус должен содержать ДНК.
 - И. Транспозазы узнают достаточно обширные последовательности, окружающие сайты встраивания, так что транспозон не включается в середину гена и не вызывает его разрушения, которое могло бы стать летальным событием для клетки.
 - К. От подвижных элементов плазмиды отличаются своей способностью к репликации вне связи с хромосомой клетки-хозяина.
 - Л. Крупные вирусы с большей вероятностью, чем мелкие, должны иметь перекрывающиеся гены, потому что генов у них гораздо больше.
 - М. Вироиды являются необычными образованиями, потому что они не кодируют белки, но способны к репликации и вызывают ряд болезней у растений.
- 5-39** Получение кривой одностадийного роста, которая отражает увеличение числа вирусных частиц за один цикл инфекции, имело очень большое значение для определения основных параметров взаимодействия фагов с бактериями. Рассмотрим следующую кривую одностадийного роста бактериофага Т4.

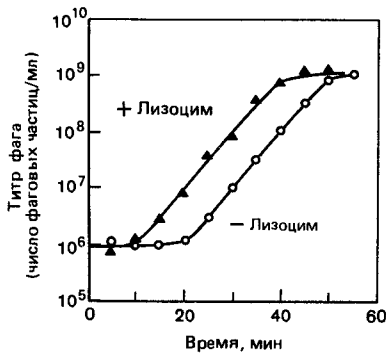


Рис. 5-31. Кривые одностадийного роста бактериофага Т4 (задача 5-39).

Небольшой образец (0,1 мл) суспензии фага Т4 (10^{10} фаговых частиц/мл) смешивали со 100 мл культуры *E. coli* (10^7 клеток/мл) и инкубировали смесь при 37°C . Затем с интервалом в 5 мин отбирали по 2 пробы инфицированных бактерий и встряхивали их с хлороформом, чтобы убить бактерии. Одну из проб обрабатывали ферментом лизоцимом, чтобы вызвать лизис бактерий. Другую пробу лизоцимом не обрабатывали. Ни хлороформ, ни лизоцим не убивают бактериофаг Т4. Во всех пробах измеряли концентрацию (титр) фаговых частиц. Результаты представлены на рис. 5-31.

- А. Каков был начальный титр Т4 сразу после его смешивания с культурой бактерий?
- Б. Почему титр фага через 5 мин становился меньше исходного?
- В. Объясните, почему титр фага в пробах, не обработанных лизоцимом, возрастал гораздо медленнее, но в конце концов достигал того же уровня, что и в пробах, обработанных лизоцимом?
- Г. Рассчитайте, сколько фаговых частиц образовывалось в среднем на одну инфицированную бактериальную клетку?

- 5-40 Бактериальная и вирусная инфекции принципиально отличаются друг от друга, и в соответствии с этим различаются стратегии борьбы с ними. Антибактериальные препараты избирательно убивают клетки бактерий, не повреждая клеток-хозяев. Вирусы нарушают метаболический механизм клетки-хозяина, используя его для своих собственных нужд. Если применять против них такие агенты, которые действуют на компоненты клетки, то будут повреждаться в одинаковой мере как инфицированные, так и неинфицированные клетки. Для успешной борьбы с вирусной инфекцией нужны лекарства, которые избирательно блокируют процессы, специфические для вирусов, но не представляют опасности для нормальных клеток-хозяев.

Одним из примеров клинически ценного противовирусного препарата может служить ацикловир (ациклогуанозин). Это сильный ингибитор репликации вируса герпеса. Ацикловир фосфорилируется с образованием ацикло-GTP тимидинкиназой, закодированной в геноме вируса герпеса, но не тимидинкиназой нормальной клетки. Ацикло-GTP включается затем в реплицирующуюся вирусную ДНК с участием ДНК-полимеразы, закодированной также в геноме вируса герпеса. Включение ацикло-GTP приводит к прекращению репликации, потому что у него отсутствует 3'-ОН-группа, необходимая для добавления следующего нуклеотида к растущей цепи.

От больных, которых лечили этим препаратом, были выделены мутанты вируса герпеса, устойчивые к ацикловиру. На репликацию этих мутантов ацикловир не действовал. Предложите два различных объяснения тому, как мог мутировать вирус герпеса, чтобы стать устойчивым к ацикловиру.

- 5-41 Если небольшое число фагов Т4 смешивают с большим количеством клеток *E. coli* штамма В и затем в тонком слое мягкого агара распределяют на поверхности толстого слоя питательного агара в чашке Петри, то бактерии растут, образуя сплошной «газон», однако в тех местах, где находятся бактерии, инфицированные фагом, фаговые частицы размножаются и убивают все соседние бактерии, приводя к образованию прозрачных круглых бляшек в мутном «газоне». Часто наблюдаемая мутация вируса приводит к изменению морфологии бляшки. Мутанты бактериофага Т4, называемые г-мутантами, были сначала открыты по их способ-

ности быстрее других образовывать бляшки в «газоне» *E. coli* (здесь «г» обозначает быстрый лизис). Один из классов г-мутантов, а именно г_{II}-мутанты, не образует бляшек в культуре *E. coli* штамм К. Эти мутанты начинают инфекцию у *E. coli*, но она носит характер абортной, и вирусы не размножаются. Особая морфология бляшек г_{II}-мутантов в культуре *E. coli* В, а также их неспособность расти на *E. coli* К были виртуозно использованы в ранних опытах по изучению основных механизмов мутирования генов и установлению триплетной структуры генетического кода.

Для практического знакомства с этими классическими исследованиями вам дали восемь г_{II}-мутантов, которые нужно охарактеризовать. Сначала вы ставите ряд тестов на образование бляшек. Вы заражаете одну пластинку агара с *E. coli* К мутантом 1, взятым в высокой концентрации, а вторую пластинку – мутантом 2 в высокой концентрации, так что много бактерий на каждой пластинке становится зараженными. Затем вы наносите по капле одного мутанта или фага Т4 дикого типа в кружки, расположенные по окружности пластинки. В качестве контроля вы наносите мутантные фаги и фаг Т4 дикого типа на «газон» незараженных бактерий *E. coli* К. После инкубации в течение ночи вы получаете результаты, показанные на рис. 5-32.

Эти результаты определенно кажутся информативными, но вам не все ясно. Чтобы определить, какой вид фага находится в прозрачных кружках, вы отбираете некоторое количество фагов из пятна, образованного фагом дикого типа, и из прозрачного пятна, образованного мутантом 5, и исследуете их рост. Фаги из пятна с фагом дикого типа образуют нормальные бляшки и на *E. coli* В, и на *E. coli* К, как и ожидалось. Большинство фагов из пятна, образованного мутантом 5, ведут себя по-прежнему как мутанты: они образуют г-бляшки на *E. coli* В, но не растут на *E. coli* К. Однако некоторые фаговые частицы из пятна, образованного мутантом 5, по-видимому, относятся к дикому типу: они образуют нормальные бляшки на обоих штаммах *E. coli*. Частота встречаемости фагов дикого типа слишком высока, чтобы она могла определяться обратным мутированием (обращением мутации), которое происходит, но с частотой всего от 10^{-5} до 10^{-6} .

- А. Почему некоторые смеси мутантных фагов растут в кружках, а другие нет?
- Б. Какую картину роста следует ожидать, если повторить тест с кружками, используя *E. coli*, зараженную мутантом 3?
- В. Насколько возросла небольшая фракция фага Т4 дикого типа в прозрачном пятне, образованном мутантом 5?

5-42 Вы выделили из животных клеток три разных вируса. Каждый из них содержит одноцепочечную РНК в качестве генома. Чтобы

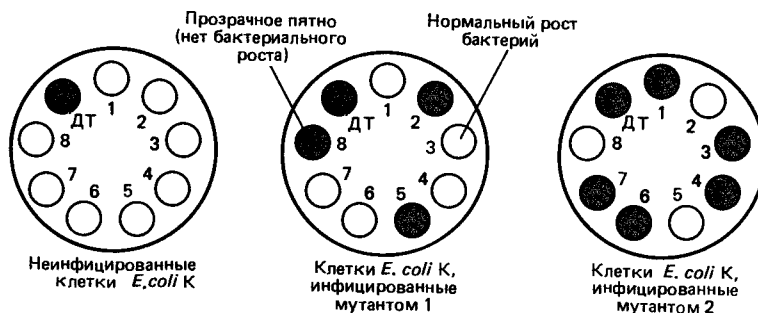


Рис. 5-32. Тест с кружками для разных г_{II}-мутантов (задача 5-41).

Рис. 5-33. Вирусной клетках (

охарактеризовать, вы исследуете их с помощью двух тестов. Во-первых, вы очищаете РНК-геномы этих вирусов и определяете их способность служить мРНК в бесклеточной системе синтеза белка. Во-вторых, вы измеряете активность их эндогенных полимераз, для чего разрушаете мягким способом интактные вирусные частицы, затем инкубируете их либо с радиоактивными рибонуклеозидтрифосфатами, чтобы определить синтез РНК, либо с радиоактивными дезоксирибонуклеозидтрифосфатами, чтобы определить синтез ДНК. Результаты этого исследования представлены в табл. 5-2. Попробуйте на их основе кратко описать жизненный цикл каждого вируса и назовите какой-либо известный вирус с таким же циклом развития.

Таблица 5-2. Характеристика трех РНК-содержащих вирусов (задача 5-42)

	Синтез белка	Эндогенная полимераза	
		РНК	ДНК
Вирус 1	—	+	—
Вирус 2	+	—	—
Вирус 3	+	—	+

5-43 Когда ретровирусы заражают клетки, их геном, представленный линейной молекулой РНК, копируется с образованием линейной двухцепочечной ДНК при участии вирусного фермента — обратной транскриптазы. Эта линейная ДНК содержит вирусные гены, «вставленные» между двумя прямыми повторами, называемыми длинными концевыми повторами, или LTR (рис. 5-33). Линейная ДНК может стать кольцевой в результате гомологичной рекомбинации между LTR, при этом в кольце будет содержаться один LTR, либо она может стать кольцевой в результате сшивания концов, в этом случае в кольце будет содержаться два LTR. Одна из форм внехромосомной ДНК встраивается в хромосому, и образуется типичная интегрированная форма вируса, которая всегда содержит два LTR, по одному с каждой стороны от вирусных генов.

Хотя точный механизм интеграции неизвестен, делеция последовательностей на концах LTR препятствует интеграции, что указывает на важную роль по крайней мере части структуры LTR. Поскольку есть три формы неинтегрированной ДНК, то любая из них или все три могли бы быть предшественниками интегрирован-

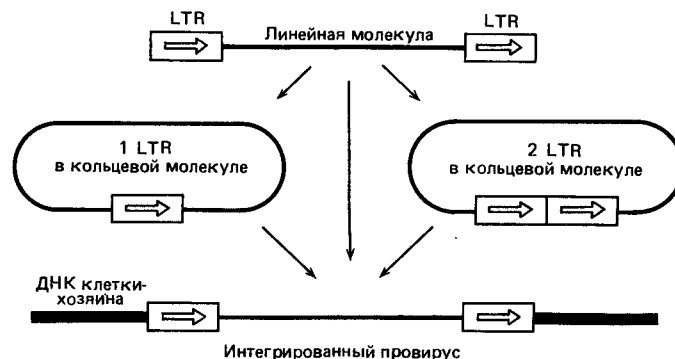


Рис. 5-33. Разные формы ретровирусной ДНК в инфицированных клетках (задача 5-43).

ной формы. Чтобы выяснить, какая форма является предшественником, для заражения клеток были использованы три разных ретровирусных генома. Эти геномы представлены в виде линейной ДНК на рис. 5-34; *A* – нормальный геном, *B* – геном с одним внутренним LTR и *B* геном с двумя внутренними LTR, ферментативно сшитыми конец в конец.

После заражения каждым геномом исследовали популяции клеток, содержащих интегрированные вирусные геномы. Из трех клеточных популяций выделяли хромосомную ДНК и обрабатывали ее диагностическими рестриктазами, которые расщепляют вирусную ДНК, как показано на рис. 5-34. Получившиеся фрагменты ДНК разделяли с помощью электрофореза в геле и фрагменты, содержащие ДНК ретровирусов, исследовали методом гибридизации с меченым зондом, специфичным для последовательностей ретровирусов. Эти результаты представлены на рис. 5-34 справа. Те фрагменты, в которых кроме последовательностей ретровирусов содержалась клеточная ДНК, на рисунке не показаны.

Пользуясь этими данными, попытайтесь установить структуру предшественника интегрированной формы вируса и объясните ваше решение.

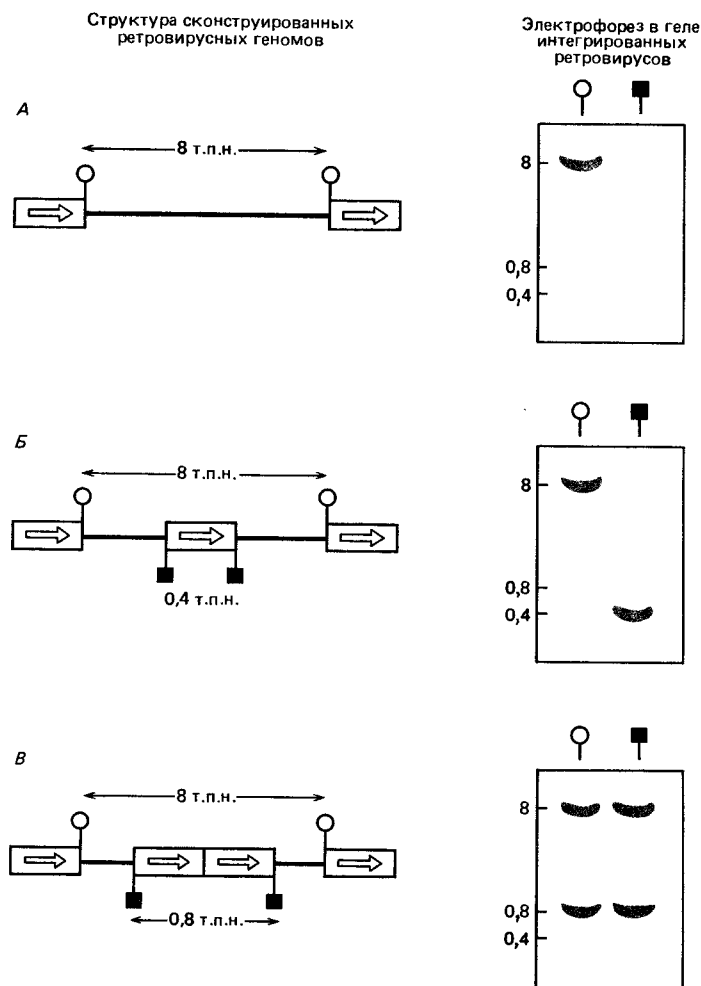


Рис. 5-34. Структура сконструированных ретровирусных геномов и анализ интегрированных форм генома после заражения (задача 5-43). Диагностические сайты рестрикции указаны кружками и квадратами. Числа обозначают длину сегментов ДНК в т. п. н.

Рис. 5
гетер
в резу
тура
бакте
Tn10
изобр
виде
ные р
тами
ными

Рис. 5-35. Репликативная и нерепликативная транспозиция подвижного элемента (задача 5-44). Подвижный элемент показан как гетеродуплекс, состоящий из двух генетически различающихся цепей — одна обозначена черным цветом, другая белым. В ходе репликативной транспозиции одна цепь остается в донорной ДНК, а другая переносится в ДНК реципиента. При нерепликативной транспозиции подвижный элемент вырезается из донорной ДНК и переносится целиком в ДНК реципиента.



5-44 Вы изучаете транспозон Tn10, существующий в прокариотических клетках, и придумали изящный эксперимент, с помощью которого можно выяснить, реплицируется ли Tn10 во время транспозиции или перемещается безотносительно к репликации ДНК. Ваша идея основана на ключевом различии между этими двумя механизмами: если транспозиция нерепликативная, то должны перемещаться обе родительские цепи Tn10, если же транспозиция репликативная, то должна перемещаться только одна родительская цепь (рис. 5-35). Вы собираетесь пометить отдельные цепи денатурированными цепями из двух различных Tn10. Чтобы эффективно вводить эти гетеродуплексные Tn10 в бактерии, вы используете ДНК бактериофага лямбда, содержащую Tn10. Такая ДНК может быть приготовлена *in vitro*, а затем упакована в капсиды, чтобы образовался фаг, способный инфицировать клетки. Вы используете неактивный (по причине других мутаций) фаговый геном, так что он не может реплицироваться или встраиваться в конце концов разрушается; таким образом, вкладом этого фагового генома можно пренебречь.

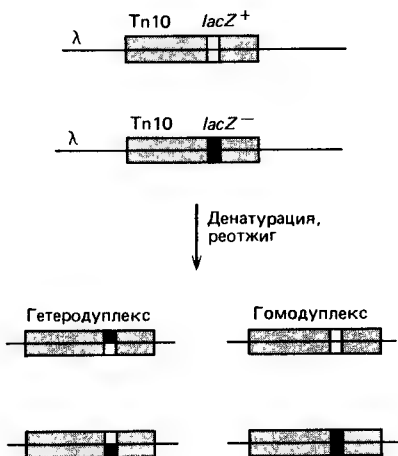


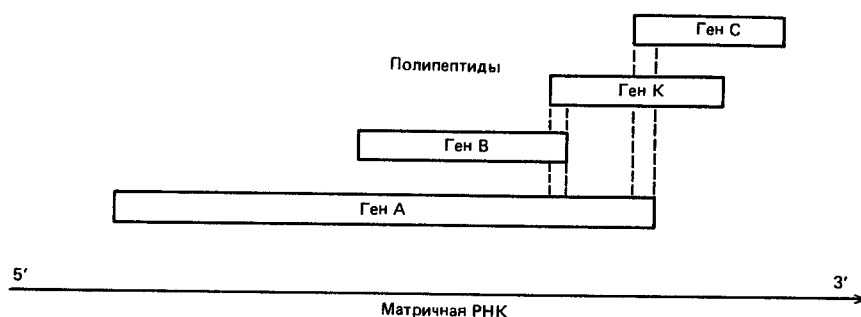
Рис. 5-36. Образование смеси гетеродуплексов и гомодуплексов в результате денатурации и ренатурации двух различных геномов бактериофага лямбда, содержащих Tn10 (задача 5-44). Фаговая ДНК изображена линиями, а Tn10 — в виде прямоугольников. Мутационные различия между двумя элементами Tn10 показаны белыми и черными сегментами.

ДНК фага несет два слабо различающихся варианта Tn10, встроенные в один и тот же сайт. Оба Tn10 содержат ген устойчивости к тетрациклину и ген метаболизма лактозы (*lacZ*), но в одном из вариантов ген *lacZ* инактивирован в результате мутации. Благодаря этому различию можно следить за двумя транспозонами Tn10, так как колонии бактерий с геном *lacZ*⁺ (если они инкубируются с соответствующим субстратом) становятся синими, а колонии бактерий с геном *lacZ*⁻ остаются белыми. Вы денатурируете и затем ренатурируете смесь двух фаговых ДНК, в результате чего образуется смесь равных количеств гетеродуплексов и гомодуплексов (рис. 5-36). Затем вы осуществляете упаковку этой смеси в фаговые капсиды, заражаете *lacZ*⁻-бактерии и производите посев инфицированных бактерий в чашки Петри на среду, содержащую тетрациклин и субстрат, дающий окраску.

Если фаговая ДНК оказывается внутри бактерии, транспозон может встраиваться (с очень низкой частотой) в бактериальный геном, которому он передает свойство устойчивости к тетрациклину. Те немногие клетки, которые приобретают Tn10, выживают в селективных условиях и дают колонии. Когда вы подсчитываете большое число таких колоний, то устанавливаете, что примерно 25% из них — белые, 25% — синие и 50% — смешанные, с одним синим и одним белым секторами.

- А. Объясните происхождение каждого вида бактериальных колоний и сделайте заключение о том, на какой тип транспозиции указывают приведенные выше наблюдения — репликативный или нерепликативный.
- Б. Для своих экспериментов вы использовали реципиентный штамм бактерий, который не обладал способностью к репарации по-

Рис. 5-37. Четыре перекрывающихся гена в фХ174 и соответствующая им мРНК (задача 5-45). Пунктирными линиями отмечены две области, где перекрываются три гена.



вреждений ДНК. Каким образом отличались бы результаты, если бы вы использовали штамм бактерий, способных исправлять повреждения в ДНК?

- В. Интегрирование ДНК бактериофага лямбда в геном бактерий с помощью сайт-специфической рекомбинации происходит гораздо чаще, чем транспозиция. Как отличались бы результаты от рассмотренных выше, если бы вы использовали мутант бактериофага лямбда, который не может реплицироваться, но может встраиваться?
- 5-45** Бактериофаг фХ174 демонстрирует пример удивительной экономии в использовании ограниченных возможностей кодирования. Он образует только одну мРНК. Однако один особый участок ДНК кодирует четыре совершенно разных белка, гены которых перекрываются, как изображено на рис. 5-37.
- А. Какой из перекрывающихся генов транслируется слева направо, как показано на рис. 5-37?
- Б. Какие из этих генов, если такие вообще существуют, транслируются с одной рамки считывания?
- В. Мутация в особом тирозиновом кодоне (ТАС) в гене для белка К приводит к появлению стоп-кодона (ТАГ). Эта мутация сопровождается заменой глутамина (САА) на глутаминовую кислоту (ГАА) в белке В. Какое изменение эта мутация вызовет в белке А, в белке С?

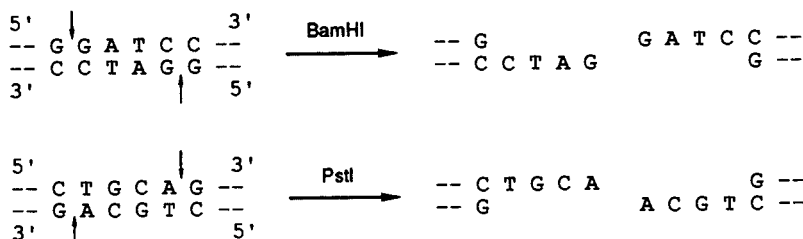
Клонирование ДНК и генная инженерия (МБК 5.6)

5-46 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. _____ разрезают двухцепочечную спираль ДНК по специфическим последовательностям, состоящим из четырех–восьми нуклеотидов (палиндромы), разделяя ее на фрагменты строго определенных размеров, которые называются _____.
- Б. С целью размножения (амплифицирования) и получения в чистом виде тех или иных генов фрагменты эукариотической ДНК могут быть встроены в специально подготовленные бактериальные вирусы или в плазмиды, называемые _____.
- В. Колония клеток, происходящая от одной клетки, называется _____ клеток.
- Г. Отдельная колония бактерий, которые содержат плазмиду с включенным в нее фрагментом ДНК человека, называется _____; набор таких бактерий, представляющий весь геном человека, составит _____.
- Д. Двухцепочечные ДНК-копии эукариотических мРНК, полученные с помощью обратной транскриптазы, могут быть встроены в век-

- торы клонирования для создания _____, которая может использоваться для выявления отдельных клонов, соответствующих определенным мРНК.
- Е. Если от одного организма имеются клетки двух близких между собой типов и при этом интересующий исследователя белок или белки производят клетки только одного типа, то перед клонированием кДНК можно прибегнуть к методу _____, позволяющему обогатить смесь определенными нуклеотидными последовательностями.
- Ж. Использование перекрывающихся клонов для продвижения от известного гена к ближайшему гену называется методом _____.
- З. Чтобы установить, содержит ли данный клон ДНК, кодирующую ранее охарактеризованный белок, часто проводят _____, т.е. клонированную ДНК используют для того, чтобы отобрать соответствующую мРНК, продукт трансляции которой можно затем сравнить с известным белком.
- И. Плазмиды или вирусы с сильными промоторами, размещенными так, что продукт клонируемого гена может производиться в большом количестве, называются _____ векторами.
- К. Новый гибридный ген, который кодирует _____, может быть образован путем соединения частей кодирующих последовательностей двух разных генов.
- Л. В клетках зародышевой линии у _____ мышей присутствуют хромосомы со стабильными изменениями, которые произошли в результате интеграции клонированной ДНК.
- М. Очищенные ДНК-полимеразы и синтетические олигонуклеотиды ДНК можно использовать для амплификации отдельных областей генома с помощью метода _____.
- 5-47** Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие нет. Если утверждение неверно, объясните почему.
- А. Не все рестрицирующие нуклеазы производят ступенчатые разрывы в ДНК.
 - Б. Плазмидными векторами, используемыми при клонировании, могут быть небольшие молекулы, которые содержат уникальные сайты рестрикции, чтобы включать чужеродную ДНК, имеют свою точку начала репликации ДНК, а также ген, сообщающий клетке устойчивость к какому-либо антибиотику.
 - В. Библиотеки кДНК содержат только те последовательности, которые экспрессировались в ткани, откуда была выделена исходная мРНК, тогда как библиотеки геномных ДНК содержат набор всех последовательностей, имеющих в организме.
 - Г. Аминокислотную последовательность эукариотического белка можно одинаково хорошо определить как при помощи клон кДНК, так и при помощи геномного клон.
 - Д. Для очистки особых типов редких мРНК можно применить метод иммунопреципитации полисом, используя специфические антитела против рибосом.
 - Е. Субтрактивная гибридизация представляет собой способ для обогащения теми мРНК, которые присутствуют в клетках одного типа и отсутствуют в клетках другого типа у одного и того же организма.
 - Ж. Чтобы получить большое количество эукариотического белка в клетках бактерий, в экспрессирующий вектор с сильным промотором помещают геномный клон, содержащий целый ген.
 - З. Трансгенных животных можно создавать путем микроинъекции

Рис. 5-38. Расщепление рестриктазами BamHI и PstI узнаваемых ими последовательностей (задача 5-48). Показаны только те нуклеотиды, которые образуют сайты узнавания.



ДНК в ядро соматической клетки, где ДНК может включаться в хромосому и таким образом сохраняться и экспрессироваться в последующих клеточных поколениях.

5-48 Рестриктазы BamHI и PstI разрезают узнаваемые ими последовательности, как показано на рис. 5-38.

А. Укажите, где находятся 5'- и 3'-концы разрезаемых молекул ДНК.
Б. Как будут модифицироваться эти концы, если инкубировать разрезанные молекулы ДНК с ДНК-полимеразой в присутствии всех четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов?

В. Могут ли концы, появившиеся в результате разрезания ферментом BamHI, соединиться вновь при инкубации с ДНК-лигазой фага Т4 после того, как была проведена реакция, о которой шла речь в пункте Б?

Можно ли соединить вместе концы ДНК, образовавшиеся при обработке PstI? (Лигаза ДНК фага Т4 соединяет вместе «тупые» концы так же, как и «липкие».)

Г. Будет ли регенерировать узнаваемый BamHI сайт, о котором шла речь в пункте В, при соединении концов? Будет ли регенерировать сайт, узнаваемый PstI?

5-49 Фермент рестрикции Sau3A узнает последовательность —GATC— и расщепляет цепь ДНК на 5'-стороне (слева) от G (поскольку верхняя и нижняя цепи большинства сайтов рестрикции читаются одинаково в направлении от 5'-к 3'-концу, только одна цепь этого сайта может быть показана для иллюстрации). Одноцепочечные концы, возникающие при расщеплении рестриктазой Sau3A, идентичны концам, возникающим при расщеплении рестриктазой BamHI (рис. 5-38), что позволяет им соединяться при инкубации с ДНК-лигазой. (Полезно нарисовать структуру продукта, образующегося в результате такого сшивания, чтобы убедиться в том, что она правильна.)

А. Какая доля сайтов, узнаваемых BamHI, может быть разрезана рестриктазой Sau3A? Какая доля сайтов, узнаваемых Sau3A, может быть разрезана рестриктазой BamHI?

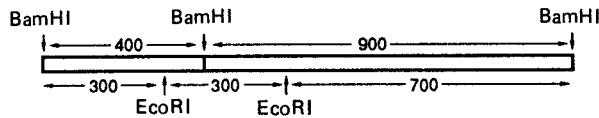
Б. Если два конца, образовавшиеся при расщеплении BamHI, сшиваются вместе, то образующийся сайт может быть снова расщеплен BamHI. То же самое справедливо для двух концов, образующихся при расщеплении Sau3A. Предположите, однако, что вы сшиваете конец, образовавшийся при обработке Sau3A, с концом, образовавшимся при обработке BamHI. Может ли гибридный сайт разрезаться рестриктазой Sau3A, рестриктазой BamHI?

В. Каков будет средний размер фрагментов ДНК, образующихся при обработке хромосомной ДНК рестриктазой Sau3A, рестриктазой BamHI?

5-50 Вы очистили два фрагмента ДНК, образующиеся при обработке

Рис. 5-
очищен-
ческое
фрагме-
(задача

Рис. 5-39. Окончательная структура гибридного гена (задача 5-50).



BamHI рекомбинантной плазмидной ДНК. Один фрагмент содержит 400 п. н., другой – 900 п. н. Вы хотите объединить их вместе, как показано на рис. 5-39, чтобы создать гибридный ген, который в том случае, если ваши ожидания правильны, будет иметь новые удивительные свойства.

Вы смешиваете два фрагмента в присутствии ДНК-лигазы и инкубируете смесь. Через 30 мин после начала инкубации и второй раз через 8 ч вы отбираете пробы и анализируете их методом электрофореза в геле. Вас удивляет, что вместо ожидаемой рекомбинантной молекулы размером 1,3 т. п. н. электрофореграмма содержит сложный набор фрагментов (рис. 5-40, А). Вы замечаете, что при более длительной инкубации интенсивность полос, соответствующих более мелким фрагментам, уменьшается, а интенсивность полос, соответствующих более крупным фрагментам, увеличивается. Если вы добавляете к смеси сшиваемых молекул BamHI, то вновь образуются исходные фрагменты (рис. 5-40, А).

Находясь в недоумении, но настойчиво продолжая исследование, вы проводите очистку фрагмента размером 1,3 т. п. н. с помощью гель-электрофореза, контролируя структуру путем обработки пробы рестриктазой BamHI. Как вы и ожидали, при этом заново появляются две исходные полосы (рис. 5-40, Б). Чтобы убедиться все-таки, что это именно та структура, которую вы хотели получить, вы обрабатываете другую пробу рестриктазой EcoRI. Вы ожидали, что при этом получатся два фрагмента длиной 300 нуклеотидов и один фрагмент размером 700 нуклеотидов. И снова вы удивлены сложностью набора полос в геле (рис. 5-40, Б).

- Почему исходная смесь соединяющихся фрагментов ДНК дает так много полос в геле?
- Почему при обработке очищенного фрагмента длиной 1,3 т. п. н. рестриктазой EcoRI образуется так много фрагментов?

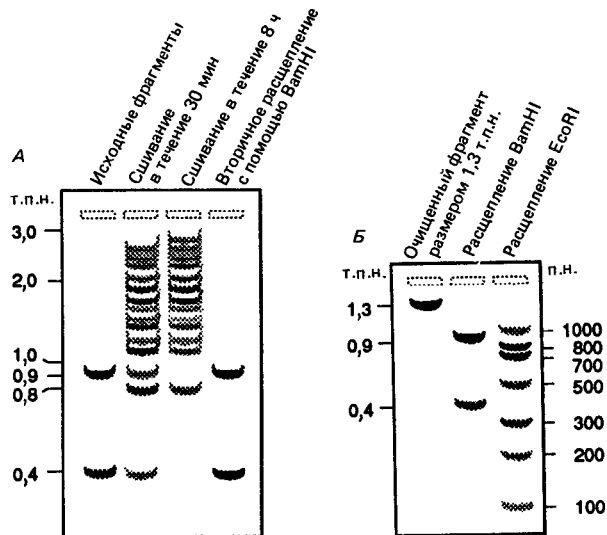


Рис. 5-40. Сшивание фрагментов очищенной ДНК (А) и диагностическое расщепление очищенного фрагмента длиной 1,3 т. п. н. (Б) (задача 5-50).



Рис. 5-41. Рекомбинантная плазмида, содержащая клонированный сегмент ДНК (задача 5-51).

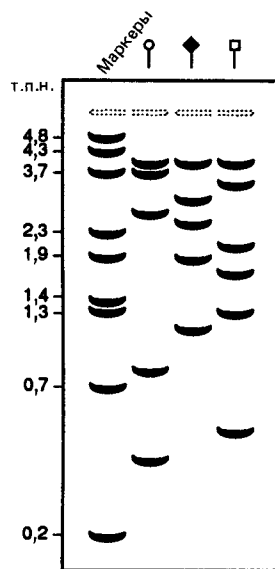


Рис. 5-42. Радиоавтограмма, показывающая электрофоретическое разделение меченых фрагментов после частичного расщепления тремя рестриктазами, обозначенными разными символами (задача 5-51). Числа слева указывают размеры маркерных фрагментов (в т. п. н.).

Рис. 5-43. Первые 30 аминокислот, определенные вашим коллегой с помощью аминокислотного анализатора (задача 5-52).

5-51 Вы провели клонирование сегмента (4000 п. н.) интересующего вас гена в плазмидном векторе (рис. 5-41) и теперь хотите получить карту рестрикции этого гена, чтобы перейти затем к другим манипуляциям с ДНК. Ваш руководитель оставил вам инструкции относительно того, как все это нужно сделать, и отправился в отпуск, так что вы можете полагаться только на себя.

Вы следуете его инструкциям, перечисленным ниже.

1. Разрезать плазмиду рестриктазой *EcoRI*.
2. Добавить к концам, образовавшимся после обработки *EcoRI*, радиоактивную метку.
3. Разрезать меченую ДНК рестриктазой *BamHI*.
4. Очистить встроенную ДНК от плазмиды.
5. Обработать меченую ДНК-вставку рестриктазой в течение короткого периода времени так, чтобы каждая меченая молекула была разрезана в среднем один раз.
6. Повторить этап 5, используя разные рестриктазы.
7. Провести электрофорез частично расщепленных ДНК в агарозном геле, причем препараты, обработанные разными рестриктазами, нанести на гель рядом друг с другом.
8. Наложить гель на рентгеновскую пленку, чтобы получился радиоавтограф фрагментов с радиоактивным концом.
9. Нарисовать рестрикционную карту.

Наиболее трудным для вас был этап 5, однако, уменьшая количество фермента и снижая температуру, вам удалось подобрать условия для частичного расщепления. Затем вы смогли полностью выполнить этап 8 и получить радиоавтограмму, представленную на рис. 5-42.

К сожалению, руководитель не объяснил вам достаточно подробно, как строить карту по данным радиоавтограммы. Он должен вернуться завтра. Хватит ли вам времени, чтобы нарисовать ее?

5-52 Полночь. Вас разбудил коллега, чтобы поделиться еще одним грандиозным проектом. Он потратил два последних года на очистку белка, представляющего собой сильный модулятор иммунного ответа. Вечером он получил первые 30 аминокислот на аминокислотном анализаторе (рис. 5-43). Ему нужен ваш совет, как лучше клонировать ген, чтобы добиться высокого уровня его экспрессии в бактериях. Он доказывает, что этот белок, благодаря стимулированию иммунной системы, мог бы служить отличным средством для лечения простуды. Он и название ему уже подобрал – иммустим.

Хотя коллега и увлекающийся человек, но он ваш друг, поэтому вы откликаетесь на его идею, пообещав позвонить через 15 мин, как только переведете аминокислотную последовательность в нуклеотидную. Какие два набора олигонуклеотидов размером по 20 нуклеотидов вы порекомендуете другу-коллеге в качестве наилучших зондов гибридизации для скрининга библиотеки геномной ДНК?

5-53 На основе своей предыдущей работы вы предполагаете, что глутамин (Q) в сегменте белка, изображенном на рис. 5-44, играет важную роль в активном центре. Ваш руководитель хочет, чтобы вы изменили белок тремя путями: заменили глутамин на лизин

10 20 30
MFYWMIGRST EDWMPYMKD FWAKHSLICE

Рис. 5-4
ДНК и
(задача

Рис. 5-45.
кисеквен
за клонир
5-54).

Рис. 5-44. Последовательности ДНК и кодируемого ею белка (задача 5-53).



L R D P Q G G V I
5' - CTTAGAGACCCGCGCAGGGCGGCGTCATC - 3'

(K), заменили глутамин на глицин (G) и просто удалили глутамин из белка. Вы планируете произвести эти мутационные изменения путем гибридизации соответствующего олигонуклеотида с ДНК вируса M13. Когда олигонуклеотид расположится вдоль кольцевой молекулы M13, с участием ДНК-полимеразы будет построена полная цепь, кодирующая комплемент желаемого мутантного белка. В качестве первого шага в осуществлении мутационных изменений предложите три олигонуклеотида размером 20 нуклеотидов, которые могли бы гибридизоваться с клонируемым геном на одноцепочечной ДНК вируса M13.

5-54 Наглядный пример использования дидезоксисеквенирующего геля показан на рис. 5-45. Попробуйте разобраться в нем. Если чтение геля начать снизу вверх, то последовательность будет соответствовать мРНК для белка. Можете ли вы обнаружить открытую рамку считывания в этой последовательности?

Рис. 5-45. Использование дидезоксисеквенирующего геля для анализа клонированной ДНК (задача 5-54).

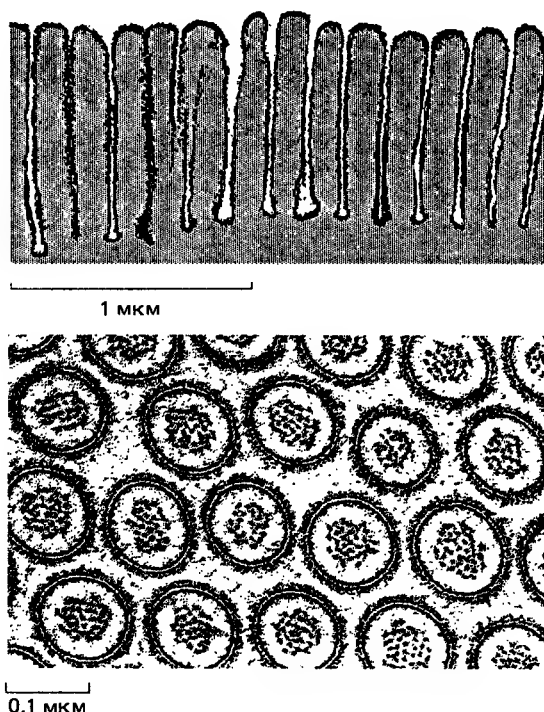
Липидный бислой (МБК 6.1)

6-1 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Молекулы липидов в биологических мембранах образуют непрерывный двойной слой толщиной 5 нм, называемый _____.
- Б. В мембранах клеток присутствуют три основных типа липидов, а именно _____, _____ и _____.
- В. Все мембранные липиды – _____, поскольку один конец их молекул гидрофильный, а другой – гидрофобный.
- Г. Гидрофильный конец молекулы фосфолипида состоит из _____ головы, а гидрофобная часть состоит из двух _____ хвостов.
- Д. При помещении амфипатических молекул в водную среду они агрегируют таким образом, что их гидрофильные концы контактируют с водой, а гидрофобные спрятаны внутри. В результате этого возникают структуры двух типов: сферические _____ или плоские _____. В обеих структурах гидрофобные хвосты размещаются между слоями гидрофильных головок.
- Е. Искусственные бислои, содержащие определенные липиды или смесь разных липидов, можно получить либо в форме сферических везикул, называемых _____, либо в форме плоских бислоев, называемых _____ мембранами.
- Ж. Метод электронного парамагнитного резонанса, который очень полезен для изучения подвижности молекул липидов, требует введения в липиды _____, например, нитроксильного радикала.
- З. При определенной (характеристической) температуре искусственные бислои липидов, получаемые на основе какого-либо одного типа фосфолипида, переходят из жидкого в твердокристаллическое состояние (или наоборот); такое изменение состояния называется _____.
- И. Липиды, содержащие олигосахариды и называемые _____, присутствуют только в наружной половине бислоя. Их углеводные группы экспонированы на поверхности клетки.
- К. Гликолипид _____ – основной нейтральный гликолипид многослойной мембранной оболочки, окружающей аксон нервной клетки, (_____ оболочка) – может играть важную роль во взаимодействии аксона с клеткой, влияя на обертывание мембраны вокруг аксона.
- Л. Гликолипиды, имеющие в своем составе сиаловую кислоту, называются _____. Один из таких гликолипидов – _____, связывающий холерный токсин.

- 6-2 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие – нет. Если утверждение неверно, объясните почему.
- А. Липидный бислой – основной структурный компонент всех клеточных мембран.
 - Б. Для сохранения липидного бислоя в плазматической мембране необходимо действие специальных ферментов и гидролиз АТР.
 - В. Молекулы липидов свободно диффундируют в плоскости бислоя, но не могут преодолеть его в поперечном направлении путем мгновенного перескока молекулы с одной стороны бислоя на другую (транслокация, или «флип-флоп»), если в мембране нет особых ферментов, известных под названием транслокаторов фосфолипидов.
 - Г. Температура, при которой мембрана эукариотических клеток «замерзает», прямо зависит от количества содержащегося в мембране холестерина.
 - Д. Изменения формы мембран, обусловленные значительным сжатием или растяжением обеих сторон липидного бислоя, возможны благодаря высокому содержанию холестерина, так как в отличие от фосфолипидов холестерол может легко перемещаться из одного монослоя в другой при таких воздействиях.
 - Е. Генетически измененные эукариотические клетки, потерявшие способность к синтезу холестерина, подвергаются лизису при добавлении холестерина в культуральную среду.
 - Ж. Головы фосфолипидов на внешней поверхности клетки несут чистый положительный заряд, потому что холиновые группы голов фосфатидилхолина $-(CH_3)_3N^+CH_2CH_2OH$ – размещаются преимущественно в наружном монослое.
 - З. Та поверхность мембраны эритроцита, которая обращена внутрь клетки, заряжена отрицательно, потому что в этой половине бислоя имеется относительный избыток фосфатидилсерина.
 - И. В живых клетках гликолипиды никогда не выявляются на той поверхности мембраны, которая обращена к цитоплазме.
- 6-3 Регуляция поступления питательных веществ в клетку – основная функция плазматической мембраны. Эта функция особенно отчетливо проявляется у эпителиальных клеток, выстилающих кишечник, поскольку через них проходит весь поток питательных веществ, поступающих в организм. В соответствии с этим их плазматическая мембрана устроена так, что на той стороне клеток, которая обращена в полость кишечника, она уложена в виде многочисленных пальцевидных выростов, называемых микроворсинками. За счет этого поверхность эпителиальных клеток многократно возрастает, что способствует более эффективному поглощению питательных веществ. На рис. 6-1 микроворсинки изображены в профиль и в поперечном разрезе. По представленным на этом рисунке масштабам попытайтесь оценить, насколько увеличивается поверхность клетки (обращенная в полость кишечника) за счет дополнительной поверхности микроворсинок по сравнению с поверхностью клетки, покрытой плоской плазматической мембраной.
- 6-4 Представьте себе, что ваш товарищ только что вернулся из путешествия по Африке. При переправе через реку Лимпопо его укусила ядовитая водяная змея, и он чуть не умер от интенсивного гемолиза. Как истинный биолог, ваш товарищ, до того как потерял сознание, поймал эту змею и теперь попросил вас проанализировать ее яд, чтобы установить природу его гемолитической

Рис. 6-1. Микроворсинки эпителиальных клеток кишечника (вид сбоку и поперечный срез) (задача 6-3). (С разрешения д-ра Ито и д-ра Ишикава.)



активности. Вы обнаруживаете, что в яде присутствуют протеаза (разрывающая пептидные связи в белках), нейраминидаза (отщепляющая остатки сиаловой кислоты от ганглиозидов) и фосфолипаза (расщепляющая фосфолипиды). В результате обработки изолированных эритроцитов этими очищенными ферментами были получены данные, приведенные в табл. 6-1.

Анализ продуктов гемолиза, вызываемого фосфолипазой, показал необычно высокое содержание в них свободного фосфорилхолина (холина, соединенного с остатком фосфорной кислоты) и диацилглицерола (глицерола, соединенного с двумя цепями жирных кислот).

- А. Что служит субстратом для фосфолипазы, в каком участке молекулы субстрат расщепляется?
- Б. На основании ваших знаний о структуре плазматической мембраны объясните, почему фосфолипаза вызывает лизис эритроцитов, а протеаза и нейраминидаза – нет.

6-5 Предположим, что вас интересует распределение различных фосфолипидов в плазматической мембране эритроцитов человека. Прежде всего на долю фосфолипидов в бислое эритроцитов приходится 60% массы всех липидов, тогда как доля холестерина составляет 30%, а гликолипидов – 10%. Фосфолипиды включают: фосфатидилхолин (28%), фосфатидилэтаноламин (27%), сфингомиелин (26%), фосфатидилсерин (13%) и некоторые другие, минорные, фосфолипиды (несколько процентов). Чтобы выявить распределение этих фосфолипидов, целые эритроциты и их тени обрабатывают: 1) двумя различными фосфолипазами и 2) не проникающим через мембрану флуорохромом (SITS), который, связываясь химически с первичными аминогруппами, специфически метит их.

Под действием сфингомиелиназы разрушается до 85% сфинго-

Таблица 6-1. Результаты обработки эритроцитов ферментами, выделенными из змеиного яда (задача 6-4)

Очищенный фермент	Гемолиз
Протеаза	Нет
Нейраминидаза	Нет
Фосфолипаза	Да

Ри
ни
ме
ло
Вв
ра,
пр
фо

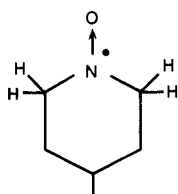
миелина в случае эритроцитов (лизиса клеток при этом не происходит) и немного больше в случае теней эритроцитов. После обработки интактных эритроцитов смесью фосфолипаз из яда морских змей в среду выходят продукты расщепления фосфатидилхолина (лизиса клеток не происходит), а при обработке теней эритроцитов эти же фосфолипазы вызывают, кроме того, разрушение фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина. Реагент SITS метит почти полностью фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин в тенях эритроцитов и лишь около 1% этих соединений в целых клетках.

А. Результаты этих опытов представлены в табл. 6-2. Они позволяют судить о распределении четырех основных фосфолипидов в мембранах эритроцитов. Какие фосфолипиды сосредоточены в обоих монослоях этих мембран и есть ли такие?

Б. Почему в этих опытах использовали эритроциты?

Таблица 6-2. Чувствительность фосфолипидов в составе эритроцитов человека и в составе теней этих клеток к фосфолипазам и к метке SITS, не проникающей через мембрану (задача 6-5)

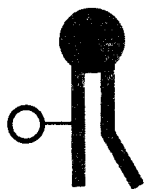
Фосфолипид	Сфингомиелиназа		Яд морских змей		Флуоресценция SITS	
	Эритроциты	Тени	Эритроциты	Тени	Эритроциты	Тени
Фосфатидилхолин	—	—	+	+	—	—
Фосфатидилэтаноламин	—	—	—	+	—	+
Сфингомиелин	+	+	—	—	—	—
Фосфатидилсерин	—	—	—	+	—	+



Нитроксильный радикал



Спин-меченный фосфолипид 1



Спин-меченный фосфолипид 2

Рис. 6-2. Схематическое изображение двух одинаковых липидов, меченных нитроксильным радикалом в различных положениях. Вверху изображен нитроксильный радикал, ниже показаны места его присоединения к молекуле фосфолипида (задача 6-6).

6-6 За поведением липидов в двух монослоях мембраны можно проследить, введя в отдельные молекулы в качестве метки нитроксильную группу, являющуюся стабильным органическим свободным радикалом (рис. 6-2). Такие спин-меченные липиды можно изучать методом электронного парамагнитного спинового резонанса (ЭПР) непосредственно в живых клетках. Перед тем как ввести спин-меченные липиды в мембраны клеток, смесь меченых и немеченых фосфолипидов обрабатывают ультразвуком с целью получения маленьких липидных везикул. При добавлении последних к суспензии целых клеток в определенных условиях везикулы сливаются с клетками, перенося меченые лиганды в их плазматическую мембрану.

На рис. 6-2 схематически изображены молекулы фосфолипида, содержащие спиновую метку в двух разных положениях. Такие меченные фосфолипиды вводили в мембраны эритроцитов описанным выше методом. Для того чтобы выяснить, одинаково ли встраиваются меченные фосфолипиды в два монослоя бислойной мембраны, в среду добавляли аскорбиновую кислоту (витамин С). Будучи восстановителем, растворимым в воде, этот реагент не проникает сквозь мембрану и разрушает все нитроксильные радикалы на внешней поверхности клетки. На рис. 6-3 представлена зависимость сигнала ЭПР от продолжительности инкубации клеток с двумя различными метками в присутствии витамина С и без него.

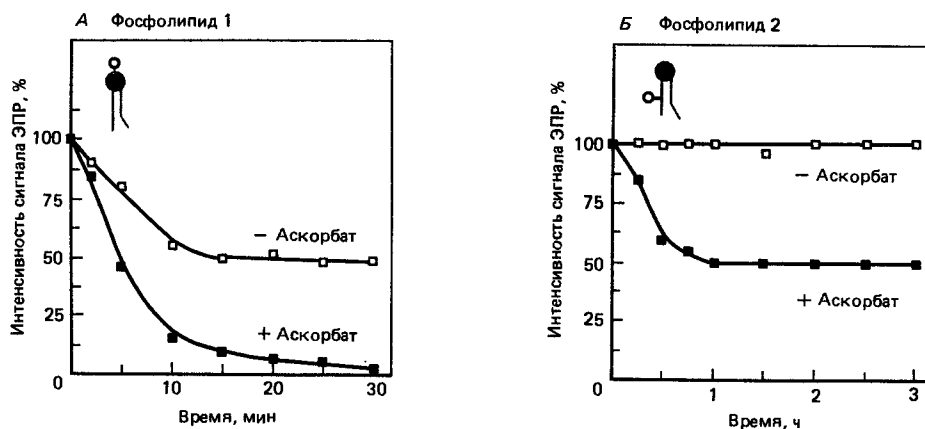


Рис. 6-3. Уменьшение интенсивности сигнала ЭПР в зависимости от длительности инкубации эритроцитов с меченым фосфолипидом 1 (А) и фосфолипидом 2 (Б) в присутствии аскорбата и без него (задача 6-6).

- А. Не учитывая пока различий в степени уменьшения сигнала ЭПР, попытайтесь объяснить, почему фосфолипид 1 (рис. 6-3, А) взаимодействует с аскорбиновой кислотой быстрее, чем фосфолипид 2 (рис. 6-3, Б). Заметьте, что область плато в случае фосфолипид 1 достигается за 15 мин, а в случае фосфолипид 2 – гораздо медленнее, за 1 ч.
- Б. Для выяснения причин того, почему эти фосфолипиды различаются по скорости и величине уменьшения сигнала ЭПР, были проведены аналогичные опыты с теньями эритроцитов, обработанными так, что они были непроницаемы для аскорбата (из-за замыкания мембраны). В этих опытах в отсутствие аскорбата не наблюдалось снижения величины сигнала ЭПР для обоих фосфолипидов, а при добавлении аскорбата сигнал устанавливался на уровне 50%. Попробуйте объяснить, чем обусловлены различия в изменениях сигнала ЭПР в опытах с теньями эритроцитов и с целыми эритроцитами (см. рис. 6-3).
- В. Одинаково ли встраивались спин-меченые фосфолипиды 1 и 2 в оба монослоя мембраны эритроцитов?

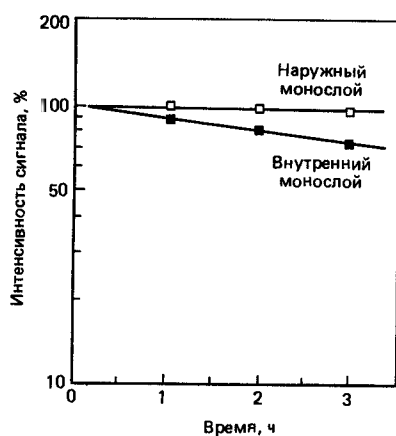


Рис. 6-4. Уменьшение величины сигнала ЭПР от эритроцитов, содержащих спин-меченые фосфолипиды в наружном и внутреннем монослоях плазматической мембраны (задача 6-7).

- 6-7 Асимметрическое распределение фосфолипидов по двум монослоям плазматической мембраны указывает на то, что спонтанный перескок липида с одной стороны мембраны на другую – редкое событие, хотя, возможно, любой спонтанный перескок быстро компенсируется соответствующими переносчиками фосфолипидов, возвращающими их на прежнее место в монослой. Для того чтобы определить, какая из этих двух возможностей реализуется, была измерена скорость перескока фосфолипидов в плазматической мембране intactных эритроцитов.

В одном из экспериментов использовали те же два фосфолипиды со спин-метками, о которых шла речь в задаче 6-6 (рис. 6-2). С целью измерения скорости транслокации от внутреннего монослоя к наружному эритроциты со спин-мечеными фосфолипидами, сосредоточенными только во внутреннем монослое плазматической мембраны, инкубировали в течение различных периодов времени в присутствии аскорбата и следили за изменением интенсивности сигнала ЭПР. Для измерения скорости перескока фосфолипидов от наружного монослоя к внутреннему определяли снижение сигнала ЭПР при инкубации эритроцитов в той же среде, но без аскорбата. Результаты этих опытов представлены на рис. 6-4.

- А. По результатам, представленным на рис. 6-4, рассчитайте скорость транслокации от внутреннего монослоя к наружному и от наружного к внутреннему. Удобно выражать такие величины как полупериод транслокации, т.е. время, за которое половина фосфолипидов перескакивает из одного монослоя в другой.
- Б. Из того что вы знаете относительно поведения двух спин-меченых фосфолипидов в задаче 6-6, попробуйте решить, какой из них был использован для мечения внутреннего монослоя плазматической мембраны целых эритроцитов, а какой – для мечения наружного монослоя.
- В. Предложите способ получения эритроцитов, содержащих спин-меченые фосфолипиды только во внутреннем или только в наружном монослое плазматической мембраны.

Мембранные белки (МБК 6.2)

6-8 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Белки, пронизывающие бислой и контактирующие с водной средой с обеих сторон клеточной мембраны, называются _____ белками.
- Б. _____ белки можно выделить из мембран мягкими методами, например экстракцией солевым раствором, тогда как _____ белки можно извлечь только при полном разрушении бислоя детергентами или органическими растворителями.
- В. Наиболее подходящими агентами для разрыва гидрофобных связей и разрушения бислоя являются _____ – небольшие амфипатические молекулы, образующие в воде мицеллы.
- Г. Препараты мембранных белков, солюбилизованных ионным детергентом додецилсульфатом натрия (ДСН), обычно не пригодны для исследования функций этих белков, поскольку они _____ при такой обработке и, потеряв свою нормальную конформацию, становятся неактивными.
- Д. Экспериментальная методика, в которой радиоизотопная или флуоресцентная метка, не проникающая через мембрану, используется для того, чтобы выяснить, на каких сторонах мембраны локализованы мембранные белки, называется _____.
- Е. _____ представляет собой длинную нитевидную молекулу – комплекс из двух очень больших полипептидных цепей, формирующих волокнистую сеть на внутренней поверхности клеточной мембраны эритроцитов.
- Ж. _____ служит в эритроцитах анионным каналом, ответственным за обмен HCO_3^- на Cl^- при выведении CO_2 из тканей организма в легкие.
- З. Использование метода _____ в электронной микроскопии позволяет расщепить липидный бислой на два монослоя, причем та поверхность скола, которая представляет собой гидрофобную часть внутреннего плазматического (или протоплазматического) монослоя мембраны, называется _____, а поверхность, представляющая собой гидрофобную часть внешней половины бислоя, называется _____.
- И. Пурпурная мембрана бактерии *Halobacterium halobium* – это особый участок плазматической мембраны, содержащий один белок – _____; этот белок превращает энергию света в градиент потенциала и протонов, который служит движущей силой образования АТФ.

- К. _____ бактериального типа первый мембранный белок, который был получен в кристаллическом состоянии и изучен методом дифракции рентгеновских лучей.
- Л. Подобно липидам мембраны, мембранные белки способны вращаться относительно оси, перпендикулярной плоскости бислоя (_____ диффузия); многие из них могут двигаться в плоскости мембраны (_____ диффузия), но они не могут перемещаться поперек бислоя (путем _____).
- М. Прямое доказательство того, что некоторые белки плазматической мембраны подвижны в плоскости мембраны, было получено в 1970 г. в изящном опыте с использованием гибридных клеток, называемых _____, которые образуются при искусственно вызванном слиянии соматических клеток мыши и человека.
- Н. Скорость латеральной диффузии мембранных белков, содержащих какой-либо хромофор или связывающих флуоресцентный лиганд, можно количественно оценить с помощью метода _____.
- 6-9** Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.
- А. Основу структуры биологических мембран составляет липидный бислой, но их специфические функции в значительной степени зависят от мембранных белков.
 - Б. Мембранные белки образуют протяженный монослой на обеих поверхностях липидного бислоя.
 - В. Возможно, что у молекул белков, которые дважды пронизывают липидный бислой, трансмембранные участки полипептидных цепей имеют β -складчатую конформацию.
 - Г. При электрофорезе в полиакриламидном геле с ДСН отдельные белки мигрируют со скоростью, обратно пропорциональной их молекулярной массе: чем крупнее молекулы белка, тем сильнее они тормозятся сложной пространственной сеткой геля и тем медленнее продвигаются от старта.
 - Д. Эритроциты человека не имеют никаких других внутренних мембран, кроме ядерной мембраны.
 - Е. Определить, что мембранный белок экспонирован с наружной стороны плазматической мембраны, можно с помощью ковалентно связанной метки или протеолитического гидролиза, но только в том случае, если мембрана остается неповрежденной.
 - Ж. Спектрин, анкирин, белок полосы 3, белок полосы 4,1 и актин связаны друг с другом нековалентно на внутренней поверхности мембраны эритроцита, за счет чего образуется сетеподобная структура, которая, как теперь считают, обеспечивает поддержание двояковогнутой формы этих клеток.
 - З. Каждая молекула бактериородопсина имеет в своем составе одну хромофорную группу, называемую ретиналем; ее активация фотоном света вызывает конформационное изменение молекулы белка, приводящее к выходу из клетки протонов.
 - И. Подвижность мембранных белков может быть ограничена в результате взаимодействия их со структурами, находящимися либо вне, либо внутри клетки.
 - К. Участки мембраны могут различаться по составу белков, однако пока нет данных об участках мембраны, различающихся по составу липидов.
- 6-10** Какие из показанных на рис. 6-5 типов связывания белков с мембраной обнаружены в биологических мембранах?

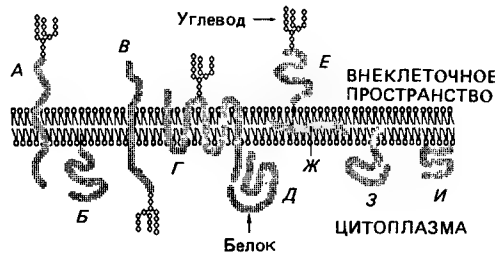
Поглощение ↑

Поглощение ↑

Поглощение ↑

Рис.
в со-
и по-
и пр-
связа-
с пом-
акри-
окрап-
Лини-
белко-
распр-

Рис. 6-5. Разнообразие возможных связей белков с мембраной (задача 6-10).



6-11 Белки, пронизывающие мембрану, обладают характерной структурой в области бислоя. Какая из трех приведенных последовательностей, состоящих из 20 аминокислот, более всего подходит на роль такого трансмембранного сегмента и подходит ли какая-то из них вообще? Объясните причины вашего выбора.

A. ITLIYFGVMAGVIGTILLIS

B. ITPIYFGPMAGVIGTPLLIS

V. ITEIYFGRMAGVIGTDLLIS

6-12 Для определения того, с какой стороны плазматической мембраны связаны основные мембранные белки – спектрин, белок полосы 3 и гликофорин, первоначально применяли ферментативный гидролиз теней эритроцитов. В этих опытах использовали сиалидазу, которая отщепляет остатки сиаловой кислоты от белка, и проназу – для расщепления пептидных связей. Белки из нормальных теней и из теней, обработанных ферментом, разделяли с помощью электрофореза в ДСН-полиакриламидном геле, а затем окрашивали на белки либо на углеводы (рис. 6-6).

A. Каким образом информация, содержащаяся в рис. 6-6, позволяет решить, на какой стороне клеточной мембраны находится углеводная часть гликофорина: на внутренней, цитоплазматической или на наружной, и какие из белков эритроцитов экспонированы на наружной поверхности последних?

B. Вы представляете свои соображения коллеге, но она оспаривает ваше заключение о том, что некоторые из этих белков не экспонированы на наружной поверхности, и предполагает вместо этого, что они устойчивы к гидролизу препаратами проназы. Какой контрольный эксперимент вы могли бы предложить для проверки такой возможности?

V. Как следовало бы модифицировать методику с использованием ферментов для выявления тех белков эритроцитов, которые пронизывают плазматическую мембрану?

6-13 Расчеты количества белков, связанных с мембраной, на клетку и доли поверхности плазматической мембраны, занятой этими белками, важны для понимания структуры плазматической мембраны. Для белков плазматической мембраны эритроцитов это вычислить наиболее просто, поскольку эритроциты легко выделить из крови и в них не содержится внутренних мембран, которые могли бы служить помехой при расчетах. С этой целью выделяют плазматические мембраны, после чего белки, связанные с мембранами, разделяют методом электрофореза в полиакриламидном геле с ДСН, а затем окрашивают красителем Кумасси синим. Поскольку интенсивность окраски в первом приближении пропорциональна количеству белка в полосе, то можно количественно определить белки, как показано в табл. 6-3.

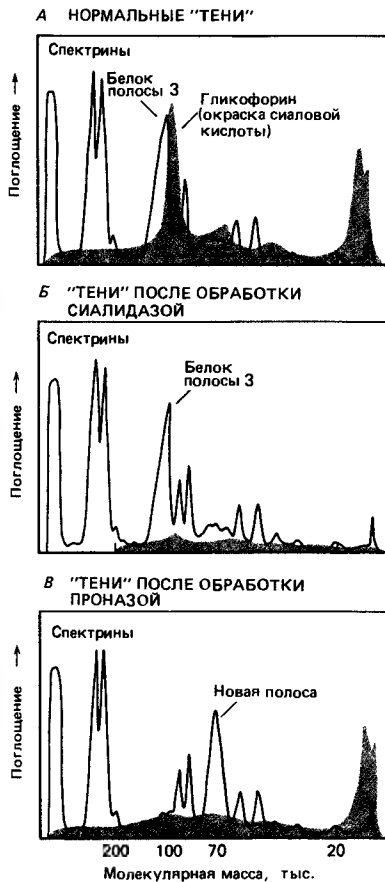


Рис. 6-6. Анализ белков, входящих в состав теней эритроцитов, до и после гидролиза сиалидазой и проназой (задача 6-12). Белки, связанные с мембраной, выделены с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с ДСН, а затем окрашены на белок и на углеводы. Линиями показано распределение белков, серым цветом обозначено распределение углеводов.

Таблица 6-3. Доля красителя, связанного с тремя белками (задача 6-13)

Белок	Молекулярная масса	Процент красителя
Спектрин	250 000	25
Белок полосы 3	100 000	30
Гликофорин	30 000	2,3

А. По данным табл. 6-3 рассчитайте число молекул спектрина, белка полосы 3 и гликофорина на одну клетку. Исходите из того, что в 1 мл суспензии тений эритроцитов содержится 10^{10} клеток и 5 мг белка мембран.

Б. Рассчитайте долю поверхности плазматических мембран, занятую белком полосы 3. Считайте, что молекула этого белка представляет собой цилиндр с радиусом 3 нм и высотой 10 нм, ориентированный в мембране, как показано на рис. 6-7. Общая поверхность эритроцита – 10^8 нм².

6-14 Одна из труднейших проблем мембранологии – выявление связей между различными мембранными белками. Связи между спектрином, анкирином, белком полосы 3 и актином, за счет которых возникает сетеподобная структура на цитоплазматической стороне мембраны эритроцитов, изучали различными методами. Один из самых распространенных методов основан на использовании антител, специфичных к данным белкам. В этом случае инкубируют смесь двух белков и затем добавляют антитела, специфичные к одному из них. Образующиеся при этом комплексы белок – антитело осаждают и анализируют. Результаты применения этого метода для смесей спектрина, анкирина, белка полосы 3 и актина суммированы в табл. 6-4.

На основании данных таблицы сделайте заключение о связях между этими белками.

Таблица 6-4. Преципитация мембранных белков эритроцитов антителами, специфичными к отдельным белкам (задача 6-14)

Смесь белков	Специфичность антител	Белки в осадке
1. Белок полосы 3 + актин	Актин	Актин
2. Белок полосы 3 + спектрин	Спектрин	Спектрин
3. Белок полосы 3 + анкирин	Анкирин	Белок полосы 3 + анкирин
4. Актин + спектрин	Спектрин	Актин + спектрин
5. Актин + анкирин	Анкирин	Анкирин
6. Спектрин + анкирин	Спектрин	Спектрин + анкирин

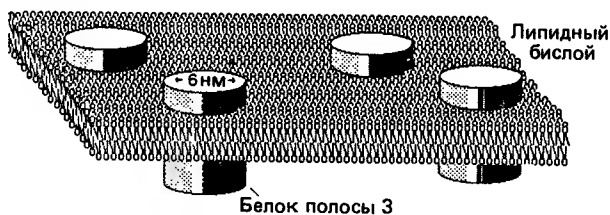


Рис. 6-7. Схема расположения белка полосы 3 (показан в виде цилиндра) в плазматической мембране (задача 6-13).

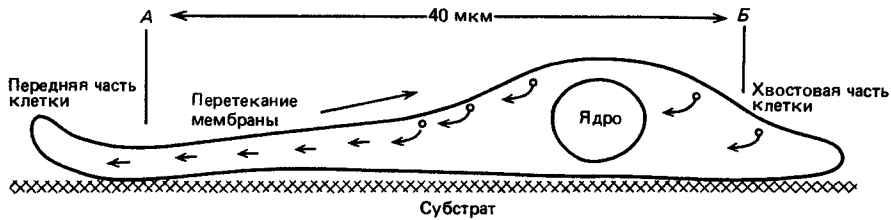


Рис. 6-8. Схематическое изображение поперечного сечения подвижного фибробласта, перемещающегося в левую сторону (задача 6-15). Стрелки внутри клетки показывают эндоцитоз липидов в составе окаймленных ямок (маленькие кружки) и их последующее перемещение к передней части клетки для встраивания в мембрану. Постоянное включение новых мембранных участков в передней части клетки создает в плазматической мембране поток, направленный к хвостовой части клетки.

6-15 Плазматические мембраны клетки – не статические структуры. В подвижных клетках, например культивируемых фибробластах, новые участки липидного бислоя обычно добавляются к плазматической мембране путем экзоцитоза в том конце клетки, который находится впереди по ходу движения, тогда как старые участки липидного бислоя изымаются путем эндоцитоза почти по всей клеточной поверхности (рис. 6-8). Этот процесс создает направленный поток липидов от передней границы клетки со скоростью около 1 мкм в минуту. Белки, распределение которых в мембране продолжает быть случайным, должны достаточно быстро диффундировать, чтобы противостоять такому потоку, иначе они соберутся в хвостовой части клетки. Оценки скорости диффузии белков в плазматической мембране дают величину от 10^{-8} до 10^{-10} см²/с при 37°C. Достаточно ли такие скорости диффузии для поддержания равномерного распределения белков в мембране?

Белок можно считать равномерно распределенным, если отношение его концентраций в двух достаточно удаленных друг от друга точках поверхности близко к 1; если же оно гораздо ниже 1, то молекулы белков распределены по поверхности мембраны неслучайным образом. Уравнение, связывающее скорость мембранного потока и скорость диффузии белков с их концентрациями в двух точках на поверхности клетки, записывается следующим образом:

$$\frac{C_A}{C_B} = e^{-(FL/D)},$$

где C_A и C_B – концентрации белка в точках А и В на поверхности клетки (рис. 6-8); F – скорость мембранного потока; L – расстояние между точками А и В вдоль направления этого потока и D – коэффициент диффузии мембранных белков.

- А. Используя это уравнение, определите, какая из измеренных для мембранных белков скоростей диффузии (10^{-8} , 10^{-9} или 10^{-10} см²/с) достаточна для сохранения их равномерного распределения в плазматической мембране.
- Б. К чему приведет снижение скорости диффузии мембранного белка, вызванное объединением молекул в большие агрегаты за счет перекрестного взаимодействия со специфичными антителами?

Мембранные углеводы (МБК 6.3)

6-16 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. На поверхности клеток эукариот имеются три вида молекул, содержащих углеводы: _____, _____ и _____.
- Б. Олигосахариды, взаимодействующие с мембранными белками, присоединяются к остаткам аспарагина (_____ олигосаха-

- риды) либо к остаткам серина или треонина (_____ олигосахариды).
- В. Белки, которые узнают определенные остатки сахаров, называются _____.
- Г. Богатый углеводами слой на поверхности большинства клеток эукариот называется _____ или _____.
- 6-17** Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие – нет. Если утверждение неверно, объясните почему.
- А. Большая часть белков, размещающихся на поверхности клетки, связана с сахарами, тогда как менее 10% липидов в наружной части бислоя большинства плазматических мембран представлены гликолипидами.
 - Б. В молекулах гликолипидов имеется только одна боковая олигосахаридная цепь, а в молекулах гликопротеинов их обычно больше.
 - В. В молекулах протеогликанов белка содержится больше, чем углеводов, тогда как в гликопротеинах содержится больше углеводов, чем белка.
 - Г. Хотя большинство протеогликанов относится к веществу внеклеточного матрикса, существуют также интегральные мембранные протеогликаны.
 - Д. В плазматической мембране все углеводы обращены кнаружи от поверхности клетки, а все углеводы внутренних мембран обращены к цитоплазме.
 - Е. Молекулы углевода, образующего гликокаликс, всегда прикреплены к гликопротеинам и протеогликанам, относящимся к интегральным мембранным белкам.
- 6-18** Предположим, что вы изучаете связывание белков с внутренней поверхностью плазматической мембраны культивируемых клеток нейробластомы. Вы нашли метод, который позволяет получать из плазматической мембраны вывернутые наизнанку пузырьки (везикулы). Однако в ваших препаратах везикул есть, к сожалению, в том или ином количестве примесь правильно замкнутых везикул. Что бы вы ни делали, избежать этого не удастся. Ваш коллега предложил подвергнуть полученные везикулы аффинной хроматографии, пропустив их через колонку, приготовленную из гранул, к которым присоединены лектины. В чем смысл этого предложения?
- 6-19** Цитохалазин В – антибиотик, который часто используют как ингибитор клеточной подвижности, обеспечиваемой актином, – служит также мощным конкурентным ингибитором поглощения D-глюкозы клетками млекопитающих. Когда тени эритроцитов инкубируют с цитохалазином В, меченным ^3H , а затем облучают ультрафиолетовым светом, происходит связывание цитохалазина с переносчиком глюкозы за счет поперечных сшивок. Если в среде имеется избыток D-глюкозы, то меченый цитохалазин не взаимодействует с переносчиком. Однако избыток в среде L-глюкозы (которая не переносится через мембрану) не влияет на связывание. Если мембранные белки из меченых теней разделить при помощи гель-электрофореза в полиакриламидном геле с ДСН, то переносчик выявляется в виде размытой радиоактивной полосы в диапазоне молекулярных масс от 45 000 до 70 000 Да. Если меченые тени до проведения электрофореза обработать ферментом, отщепляющим связанные сахара, то эта размытая полоса исчезает и вместо

нее наблюдается гораздо более четкая полоса в положении 46 000 Да.

- А. Почему именно D-глюкоза, а не L-глюкоза препятствует образованию поперечных сшивок между молекулами цитохалазина и переносчиком глюкозы?
- Б. Почему переносчик глюкозы представлен на электрофореграмме в виде размытой полосы?

Транспорт через мембрану малых молекул (МБК 6.4)

6-20 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Чтобы небольшие полярные молекулы, например сахара, аминокислоты, а также ионы могли проходить через мембрану клетки, необходимы особые белки, называемые _____ белками, которые осуществляют их перенос.
- Б. Есть два больших класса мембранных транспортных белков: белки-_____, которые специфически связываются с веществами, содержащимися в среде, и изменяют свою конформацию, чтобы перенести эти вещества через мембрану; и белки-_____, образующие в мембране заполненные водой поры, через которые определенные вещества могут пересекать мембрану по электрохимическому градиенту.
- В. Поступление веществ в клетку регулируется двумя основными транспортными процессами: _____ транспортом, не требующим затрат энергии, и _____ транспортом, при котором отдельные растворенные вещества проходят через мембрану против градиента концентрации.
- Г. Градиент концентрации ионов вещества и мембранный потенциал составляют _____ градиент этого вещества.
- Д. Поступление сахаров в клетки кишечника осуществляется путем _____ ионов натрия с молекулами этих сахаров.
- Е. Белок полосы 3 эритроцитов человека, который служит переносчиком _____, осуществляет сопряжение транспорта ионов Cl^- в одном направлении с транспортом ионов HCO_3^- в другом направлении. Он является хорошим примером переносчика, действующего по принципу _____.
- Ж. _____ ингибируется убаином.
- З. Система трубчатых цистерн в мышечных клетках, которая при помощи АТФ-зависимого Ca^{2+} -насоса накапливает ионы Ca^{2+} , называется _____.
- И. В плазматической мембране клеток большинства позвоночных содержится переносчик, осуществляющий обмен _____; он играет важную роль в регуляции внутриклеточного pH и является мишенью для лекарственного препарата _____, обладающего ингибиторным действием.
- К. Тонкие пальцевидные выросты, называемые _____, на апикальных поверхностях эпителиальных клеток почек и кишечника увеличивают всасывающую площадь последних в 25 раз.
- Л. Транспорт некоторых сахаров через плазматическую мембрану бактерий сопряжен с их фосфорилированием во время переноса, при этом в качестве донора макроэргического фосфата используется фосфоенолпируват, а не АТФ. Этот тип транспорта называется _____.
- М. Бактерии с двойными мембранами на поверхности клеток (например, *E. coli*) содержат ряд белков, образующих каналы в наружной мембране. Эти белки носят название _____.

В пространстве между внутренней и наружной мембранами находятся только водорастворимые _____ белки, которые связывают растворенные вещества на первом этапе их переноса, а также действуют как рецепторы при хемотаксисе.

- Н. Белки-_____ образуют поры в мембране клеток эукариот; эти поры заполнены водой. Почти все эти белки в плазматической мембране эукариот осуществляют избирательный транспорт ионов и называются поэтому _____.
- О. Известны четыре вида сдвигов, которые могут привести к открытию или закрыванию ионных каналов, имеющих «ворота»: _____, _____, _____ и _____.
- П. Неодинаковое распределение ионов по двум сторонам от плазматической мембраны приводит к возникновению на ней электрического потенциала, называемого _____. Он целиком зависит от существования _____ каналов, благодаря которым проницаемость мембран большинства животных клеток для ионов K^+ в 100 раз выше, чем для ионов Na^+ .
- Р. За счет регулируемых потенциалом ионных каналов, имеющих в плазматических мембранах, нервные и мышечные клетки могут проводить _____, который представляет собой кратковременную самораспространяющуюся деполяризацию мембраны.
- С. Очень важный метод, при помощи которого можно изучать поведение отдельных каналов в клеточных мембранах, называют техникой _____.
- Т. Специфическими ингибиторами _____ натриевого канала являются токсичное вещество _____ (ГТХ), содержащееся в деликатесной, но опасной японской рыбе из семейства иглобрюховых, и яд _____, обнаруженный в моллюске, питающемся динофлагеллятами (вызывающими «красное цветение» моря).
- У. Передача сигналов от нервных клеток к клеткам-мишеням происходит через особые области, известные под названием _____, где регулируемые ионные каналы клетки-мишени отвечают на присутствие сигнальной молекулы-медиатора, называемого _____, открыванием или закрыванием каналов и изменением потенциала на мембране.
- Ф. При передаче сигнала от нервных клеток к клеткам скелетных мышц из нервных клеток выделяется _____, который связывается с _____, находящимися в мембране мышечных клеток (в участке нервно-мышечного соединения).
- Х. Небольшие гидрофобные молекулы, которые увеличивают проницаемость мембраны для определенных ионов, называются _____. Известны два типа таких веществ: _____ и _____. Валиномицин и A23187 – примеры веществ первого типа, специфичных к _____ и _____ соответственно; грамицидин А – классический пример вещества второго типа.

6-21 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие – нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Плазматическая мембрана непроницаема для всех заряженных молекул.
- Б. Все известные до сих пор транспортные белки мембран пронизывают липидный бислой. Их полипептидные цепи обычно перешнуровывают мембрану несколько раз.
- В. Лиганды белков-переносчиков перемещаются напоподобие вращающейся двери, не нарушая целостности липидного бислоя.
- Г. На работу ($Na^+ + K^+$)-насоса расходуется третья часть общего

количества генерируемой в клетках АТР; он обеспечивает поддержание высокой концентрации K^+ внутри клеток, регуляцию клеточного объема, а также поглощение сахаров и аминокислот в кишечнике и почках.

- Д. АТР обеспечивает $(Na^+ + K^+)$ -насос энергией, фосфорилируя остаток аспарагиновой кислоты только при связывании Na^+ ; образовавшийся аспартилфосфат дефосфорилируется только при связывании K^+ . Конформационные изменения, сопровождающие цикл фосфорилирования – дефосфорилирования, приводят насос в действие.
- Е. В покоящейся мышце кальциевый насос саркоплазматического ретикулума фосфорилируется; при этом он активируется и поддерживает внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} на низком уровне. При возбуждении мышцы этот насос дефосфорилируется и тем самым инактивируется, в результате чего ионы Ca^{2+} выходят из саркоплазматического ретикулума и происходит инициация мышечного сокращения.
- Ж. Светоиндуцируемая протонная помпа у *Halobacterium* синтезирует АТР из АДФ и неорганического фосфата, когда ионы H^+ откачиваются из клетки через мембрану.
- З. Для увеличения внутриклеточного рН при оплодотворении яиц морского ежа необходимо присутствие ионов натрия во внешней среде. Увеличение рН ингибируется лекарственным препаратом амилоридом, что указывает на участие в этом процессе переносчика, обменивающего ионы Na^+ на H^+ .
- И. Белки, формирующие каналы (например, потенциалзависимый Na^+ -канал), переносят ионы гораздо быстрее, чем белки-переносчики (такие, как $(Na^+ + K^+)$ -насос), при этом они не зависят от источников энергии; следовательно, транспорт при помощи каналов – это всегда пассивный транспорт.
- К. Потенциал покоя на мембране типичной животной клетки возникает преимущественно благодаря работе $(Na^+ + K^+)$ -насоса, который за каждый цикл переносит три иона Na^+ из клетки и два иона K^+ в клетку, в результате чего внутри нее накапливается избыточный отрицательный заряд.
- Л. При возбуждении нервной клетки поступление ионов Na^+ в нее ограничивается двумя процессами: 1) мембранный потенциал достигает значения потенциала равновесия для ионов Na^+ , что приводит к прекращению дальнейшего входа этих ионов, и 2) Na^+ -каналы инактивируются и не могут снова открыться, пока не восстановится исходный уровень потенциала покоя.
- М. Градиент потенциала между поверхностями липидного бислоя резко меняется при прохождении нервного импульса, что вызывает конформационные изменения в белках, формирующих потенциалзависимые каналы.
- Н. Ионные каналы, состояние которых регулируется лигандами, открываются в ответ на появление специфических нейромедиаторов в микроокружении этих каналов, однако они нечувствительны к мембранному потенциалу. Следовательно, сами по себе они не могут генерировать потенциал действия.

6-22 Гормон инсулин – это небольшой белок, который связывается с рецептором на плазматической мембране жировых клеток. В результате этого связывания скорость поглощения глюкозы клетками резко и быстро (в течение нескольких минут) возрастает, причем это увеличение не блокируется ингибиторами синтеза белков или гликозилирования. Следовательно, инсулин должен

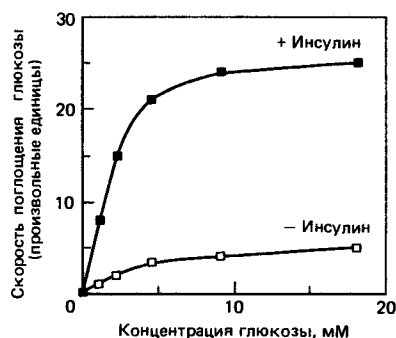


Рис. 6-9. Скорость поглощения глюкозы клетками в присутствии и в отсутствие инсулина (задача 6-22).

увеличивать активность переносчика глюкозы в плазматической мембране, но не общее число таких переносчиков в клетке. Результаты двух описанных ниже опытов указывают на возможный механизм действия инсулина. В первом опыте измеряли начальную скорость поступления глюкозы в контрольные клетки и в клетки, обработанные инсулином. Результаты приведены на рис. 6-9. Во втором опыте измеряли концентрацию переносчика глюкозы во фрагментах мембран, полученных из контрольных клеток и клеток, обработанных инсулином (табл. 6-5). О концентрации переносчика судили по количеству связанного цитохалазина В, содержащего радиоактивную метку.

Таблица 6-5. Количество переносчика глюкозы, связанного с плазматической мембраной и с внутренними мембранами, в присутствии и в отсутствие инсулина (задача 6-22)

Мембранная фракция	Связанный ^3H -цитохалазин В, имп/(мин · мг белка везикул)	
	Необработанные клетки (– инсулин)	Обработанные клетки (+ инсулин)
Плазматическая мембрана	890	4480
Внутренние мембраны	4070	480

А. Объясните механизм, за счет которого транспорт глюкозы возрастает в обработанных инсулином клетках.

Б. Транспортные белки можно охарактеризовать, подобно ферментам, кинетическими параметрами K_M (концентрация субстрата, при которой скорость транспорта равняется половине максимальной величины) и $V_{\max}$ (скорость транспорта, достигаемая при насыщении субстратом). Изменяются ли при стимуляции инсулином эти кинетические характеристики переносчика глюкозы? Что можно сказать на этот счет, исходя из представленных здесь данных?

6-23 Сколько энергии требуется для переноса веществ через мембрану? Или, другими словами, какой величины градиент концентрации вещества может поддерживаться за счет гидролиза АТФ при его активном транспорте, который зависит прямо или косвенно от АТФ? Изменение свободной энергии (ΔG_{in}) при транспорте 1 моля вещества внутрь клетки можно вычислить следующим образом:

$$\Delta G_{\text{in}} = -2,3RT \log_{10} \frac{C_o}{C_i} + zFV,$$

где R – газовая постоянная, $1,98 \times 10^{-3}$ ккал/(К · моль),

T – абсолютная температура в К ($37^\circ\text{C} = 310$ К),

C_o – концентрация растворенного вещества в среде,

C_i – концентрация растворенного вещества внутри клетки,

z – валентность (заряд) растворенного вещества,

F – постоянная Фарадея, 23 ккал/(В · моль),

V – мембранный потенциал в вольтах (В).

Поскольку $\Delta G_{\text{in}} = -\Delta G_{\text{out}}$, изменение свободной энергии для транспорта из клетки будет описываться уравнением:

$$\Delta G_{\text{out}} = 2,3 \log_{10} \frac{C_o}{C_i} - zFV.$$

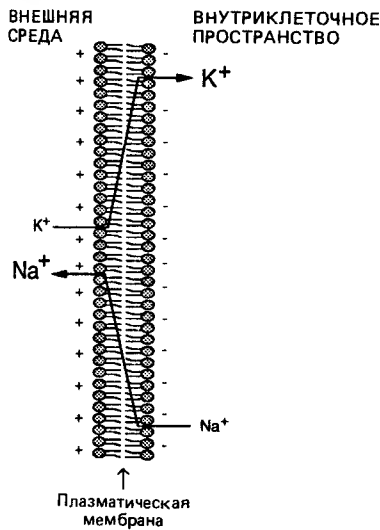


Рис. 6-10. Градиенты ионов натрия и калия и направления переноса этих ионов через плазматическую мембрану (задача 6-23). Крупные буквы означают высокую концентрацию, мелкие – низкую. Как ионы натрия, так и ионы калия переносятся против химических концентрационных градиентов, но ионы натрия перекачиваются против электрического градиента, а ионы калия – по электрическому градиенту.

Для состояния равновесия, когда $\Delta G = 0$, эти уравнения можно представить в более удобной форме, известной как уравнение Нернста:

$$V = 2,3 \frac{RT}{zF} \log_{10} \frac{C_o}{C_i}$$

Для ответа на следующие вопросы нужно исходить из того, что при гидролизе АТФ с образованием АДФ и неорганического фосфата изменение свободной энергии ΔG составляет -12 ккал/моль, т.е. этот процесс может обеспечить активный транспорт с затратой энергии $\Delta G = 12$ ккал/моль. Считайте, что $V = -60$ мВ.

- А. Какой максимальный концентрационный градиент незаряженной молекулы, например глюкозы, может быть достигнут за счет активного транспорта в клетку, обеспечиваемого энергией АТФ? Предположите, что для переноса одной молекулы растворенного вещества через мембрану необходим гидролиз одной молекулы АТФ.
- Б. Какой максимальный градиент концентрации может быть достигнут при активном транспорте Ca^{+2} из клетки? Насколько эта величина сравнима с реальным градиентом концентрации, наблюдаемым в клетках млекопитающих? (См. МБК, табл. 6-3.)
- В. Рассчитайте, сколько энергии требуется для работы $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насоса. Эта замечательная молекулярная машина на перенос пяти ионов расходует энергию гидролиза всего одной молекулы АТФ; при этом три иона натрия выходят из клетки и два иона калия входят в нее. Благодаря работе этого насоса внутриклеточная концентрация Na^+ поддерживается на уровне 10 мМ при внешней концентрации 145 мМ, а внутриклеточная концентрация K^+ – на уровне 140 мМ при внешней 5 мМ. Как видно из рис. 6-10, Na^+ переносится против градиента мембранного потенциала, тогда как K^+ – по градиенту потенциала (ΔG для всей реакции равно сумме значений ΔG для переноса отдельных ионов).
- Г. Насколько эффективен $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насос, т.е. какая доля энергии, освобождающейся при гидролизе АТФ, используется для переноса ионов?

6-24 Гигантский аксон кальмара занимает особое место в истории наших представлений о мембранном потенциале и потенциале действия. Благодаря его большому размеру (0,2–1,0 мм в диаметре и 5–10 см в длину) в него можно вводить электроды, и в прошлом такие электроды, хотя и очень крупные по сравнению с современными, позволили впервые измерить разность электрических потенциалов между цитоплазмой и внеклеточной жидкостью. При введении электрода в интактный гигантский аксон регистрируется мембранный потенциал, равный -70 мВ. Если аксон, помещенный в сосуд с морской водой, стимулировать, то при проведении нервного импульса мембранный потенциал временно возрастает от -70 мВ до $+40$ мВ. Зависимость мембранного потенциала от равновесных концентраций ионов описывается уравнением Нернста:

$$V = 2,3 \frac{RT}{zF} \log_{10} \frac{C_o}{C_i}$$

Для одновалентных ионов при 20°C (293 К) это уравнение можно представить следующим образом:

$$V = 58 \text{ мВ} \times \log_{10} \frac{C_o}{C_i}$$

Таблица 6-6. Ионный состав морской воды и цитоплазмы гигантского аксона кальмара (задача 6-24)

Ион	Цитоплазма	Морская вода
Na^+	65 мМ	430 мМ
K^+	344 мМ	9 мМ

- А. Используя это уравнение, рассчитайте потенциал для мембраны в состоянии покоя: 1) предполагая, что он создается за счет ионов калия, и 2) предполагая, что он создается только за счет ионов натрия (концентрации Na^+ и K^+ в цитоплазме аксона и в морской воде приведены в табл. 6-6). Какой из результатов ближе к измеряемой величине потенциала покоя? Какой из результатов ближе к измеряемой величине потенциала действия? Объясните, почему эти предположения позволяют рассчитать величины потенциалов покоя и действия, близкие к полученным экспериментально?
- Б. Если природную морскую воду, в которой выдерживают препарированный гигантский аксон кальмара, заменить на искусственную морскую воду, в которой NaCl заменен хлоридом холина, то потенциал покоя не изменится, но стимуляция нерва не вызовет появления потенциала действия. Что произойдет с величиной потенциала действия, если концентрация ионов Na^+ во внешней среде снизится вдвое или до одной четверти от ее нормальной величины, а осмотический баланс будет поддерживаться за счет добавления хлорида холина?

6-25 Число ионов Na^+ , поступающих в аксон во время потенциала действия, можно рассчитать теоретически. Поскольку мембрана клетки разделяет разноименные заряды, она ведет себя подобно электрической емкости. По известной величине емкости биологических мембран можно рассчитать число ионов, входящих в клетку за время потенциала действия. Исходя из величины потенциала покоя -70 мВ, можно показать, что в клетку, через 1 см^2 ее поверхности в течение потенциала действия должно войти $1,1 \times 10^{-12}$ моль ионов Na^+ .

Чтобы экспериментально определить число ионов натрия, входящих в клетку во время потенциала действия, гигантский аксон кальмара (диаметром 1 мм, длиной 5 см) был помещен в резервуар с раствором, содержащим радиоактивный Na^+ [удельная активность 2×10^{14} имп/(мин·моль)], и по всей длине аксона был передан единичный потенциал действия. Когда цитоплазму проанализировали на радиоактивность, оказалось, что внутрь аксона вошло 340 имп/мин.

- А. Насколько хорошо экспериментальные измерения соответствуют теоретическим расчетам?
- Б. Сколько ионов K^+ должно пересекать мембрану аксона и в каком направлении, чтобы восстановить потенциал покоя после завершения потенциала действия?
- В. Считая, что концентрация ионов Na^+ внутри аксона составляет 65 мМ, рассчитайте относительное увеличение концентрации этих ионов внутри аксона при прохождении по нему единичного потенциала действия.
- Г. В организме животных содержатся и совсем иные по размерам нервные клетки, например мелкие дендриты диаметром около 0,1 мкм. Полагая, что они имеют такую же длину (5 см), такую же концентрацию Na^+ в цитоплазме (65 мМ) и такие же потенциалы покоя и действия, как и гигантский аксон, рассчитайте, насколько увеличится концентрация Na^+ внутри клетки при прохождении по дендриту единичного потенциала действия.
- Д. Для каких клеток гигантского аксона или дендрита более важным фактором с точки зрения непрерывного действия служит $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насос?

6-26 Внутриклеточные изменения концентраций ионов часто оказыва-

ются пусковыми механизмами важнейших событий, происходящих в клетках. Например, в яйце моллюска при контакте со спермой быстро меняется содержание ионов, что приводит в итоге к разрыву ядерной оболочки, конденсации хромосом и инициации мейоза. Имеется два экспериментальных наблюдения, подтверждающие связь между ионными изменениями внутри клетки с появлением указанных перестроек в клетке: 1) при суспендировании яиц моллюска в морской воде, содержащей 60 мМ KCl, возникают такие же внутриклеточные изменения, как и при обработке спермой; 2) при суспендировании яиц в искусственной морской воде без Ca^{+2} не происходит их активации раствором 60 мМ KCl.

- А. Каким образом раствор 60 мМ KCl воздействует на потенциал покоя мембраны яйца? Концентрация ионов K^{+} внутри клетки составляет 344 мМ, а в обычной морской воде – 9 мМ. Вспомните (задача 6-24), что

$$V = 58 \text{ мВ} \times \log_{10} \frac{C_o}{C_i}.$$

- Б. Что можно сказать о механизме активации раствором KCl по данным второго опыта, где раствор 60 мМ KCl не активировал яйца в морской воде без кальция?
- В. Как вы считаете, что может произойти, если кальциевый ионофор, A23187, добавить к суспензии яиц (в отсутствие спермы): 1) в обычной морской воде и 2) в морской воде без кальция?

6-27 Важным параметром, необходимым для оценки любого конкретного механизма мембранного транспорта, следует считать число копий специфического транспортного белка в клеточной мембране. Предположим, вы хотите измерить в блуждающем нерве кролика число потенциал-зависимых натриевых каналов. Вы нашли в яде паука мощный токсин, который специфически инактивирует потенциал-зависимые натриевые каналы. Более того, вы обнаружили, что этот токсин можно пометить радиоактивным ^{125}I без изменения его токсических свойств. Предполагая, что с одним каналом связывается одна молекула токсина, вы можете сделать заключение, что число Na^{+} -каналов в сегменте блуждающего нерва равно максимальному числу связанных с ним молекул токсина.

Чтобы провести измерение, вы инкубируете идентичные сегменты нерва в течение 8 ч в присутствии увеличивающихся количеств меченого токсина. Затем вы отмываете сегменты (для удаления свободного токсина) и измеряете радиоактивность, связанную с сегментами нервов, чтобы снять кривую связывания токсина. Она показана на рис. 6-11 (верхняя кривая). Вас удивляет, почему не наблюдается ожидаемого максимума связывания (насыщения) при высоких концентрациях токсина, т.е. почему не достигается плато. Действительно, связывание продолжало возрастать с той же скоростью даже при высоких концентрациях токсина (верхняя кривая). По размышлении вы ставите контрольный опыт, в котором измеряете связывание меченого токсина в присутствии избытка немеченого токсина. Результаты, показанные на рис. 6-11 (нижняя кривая), сразу все проясняют и позволяют вам рассчитать число Na^{+} -каналов в мембране аксона блуждающего нерва.

- А. Почему связывание меченого токсина не достигает насыщения? В чем суть контрольного опыта и как его используют для решения данного вопроса?
- Б. Считая, что участок блуждающего нерва весом 1 г имеет площадь

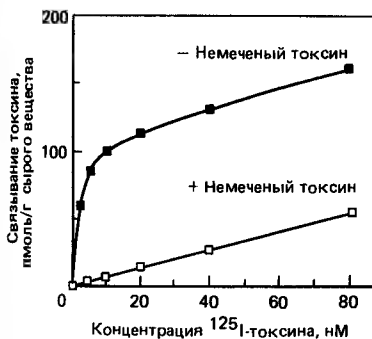


Рис. 6-11. Кривые связывания токсина в присутствии и в отсутствие тетродотоксина (задача 6-27).

поверхности мембраны аксона 6000 см^2 , и предполагая, что Na^+ -канал представляет собой цилиндр с диаметром 6 нм, рассчитайте число Na^+ -каналов на квадратный микрон мембраны аксона, а также долю поверхности клетки, занятой одним таким каналом (при расчетах используйте следующее допущение: количество токсина, специфически связанного с рецептором, равно 100 пмоль).

Мембранный транспорт макромолекул и частиц: экзоцитоз и эндоцитоз (МБК 6.5)

6-28 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Внутриклеточные везикулы сливаются с плазматической мембраной за счет механизма, известного под названием _____.
- Б. Клетки поглощают макромолекулы и частицы, окружая их небольшим участком плазматической мембраны, который впячивается внутрь клетки, образуя пузырек (везикулу); процесс известен как _____.
- В. Многие из неприятных симптомов, сопровождающих аллергические реакции, возникают из-за действия _____, который секретируется _____ клетками.
- Г. Мелкие везикулы, содержащие внеклеточную жидкость и растворенные в ней вещества, поглощаются в процессе _____, тогда как крупные частицы, например бактерии, поглощаются путем _____.
- Д. Большая часть содержимого эндоцитозных везикул, не связанного с мембраной, распадается в _____ – специализированных компартментах для внутриклеточного переваривания; что касается мембранных компонентов, то некоторые из них могут выйти неизмененными из _____ и снова встроиться в плазматическую мембрану.
- Е. Цикл эндоцитоза начинается в особых участках плазматической мембраны, называемых _____, которые у различных культивируемых клеток занимают около 2% поверхности.
- Ж. Наиболее изученный белок, обнаруженный в окаймленных везикулах, называется _____. Он состоит из трех больших и трех малых полипептидных цепей, образующих как бы трехногую структуру. Эта молекулярная конфигурация называется _____.
- З. Макромолекулы, связывающиеся со специфическими рецепторами на поверхности клетки, поглощаются посредством механизма, называемого _____; вещества, растворенные во внеклеточной жидкости, также могут поглощаться клеткой, но намного медленнее, с помощью _____.
- И. Холестерол присутствует в крови в основном в составе крупных сферических частиц диаметром 22 нм, называемых _____, или сокращенно ЛНП.
- К. Путем эндоцитоза макромолекулы попадают в _____ компартмент, появляясь в _____ примерно через минуту и в _____ через 5–15 мин.
- Л. Железо переносится в крови специальным транспортным белком _____.
- М. Эпителиальные клетки начинают делиться после того, как небольшой белок _____ связывается со специфическими рецепторами в плазматической мембране.
- Н. За связыванием ФРЭ следует поглощение клеткой рецепторов и разрушение их в лизосомах; в результате концентрация рецеп-

торов ФРЭ на поверхности клеток снижается. Это явление известно как _____.

- О. У новорожденных детенышей млекопитающих антитела из материнского молока переносятся через кишечный эпителий путем _____.
- П. В подвижных клетках липиды и рецепторы в плазматической мембране движутся к задней части клетки от ее ведущего переднего края в процессе _____; этим объясняется тот факт, что молекулы плазматической мембраны, связанные с антителами или лектинами, переносятся к задней части клетки в процессе, называемом _____.
- Р. У млекопитающих имеется два типа «профессиональных фагоцитов»: _____, которые встречаются не только в крови, но и во многих тканях, и _____, которые находятся только в крови.
- С. Во время _____ остатки клеток и микроорганизмы поглощаются большими эндоцитозными везикулами, именуемыми _____; эти везикулы сливаются с лизосомами, образуя _____.
- Т. _____, т.е. процесс слипания и объединения липидных бислоев, вероятно, катализируется специализированными белками, _____.

6-29 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Как при экзоцитозе, так и при эндоцитозе происходит слияние мембран, но в разных направлениях относительно плазматической мембраны.
- Б. Вещества, секретируемые клеткой в ответ на внешний сигнал, хранятся в секреторных везикулах (гранулах); вещества, секретируемые конститутивно, не заключаются в везикулы.
- В. Выделение вещества в среду из секреторных везикул и доставка новых компонентов к плазматической мембране из аппарата Гольджи происходят по механизму экзоцитоза.
- Г. Клетки поглощают макромолекулы из внешней среды с помощью двух различных молекулярных механизмов: отдельные макромолекулы захватываются путем эндоцитоза, опосредуемого рецепторами, тогда как частицы захватываются путем фагоцитоза.
- Д. Цикл эндоцитоза начинается в особых участках плазматической мембраны, называемых окаймленными ямками, в которых клатрин и связанные с ним белки осуществляют инвагинацию мембраны.
- Е. Перинуклеарные эндосомы сливаются с лизосомами с образованием вторичных лизосом.
- Ж. Кислая реакция среды в лизосомах имеет решающее значение для сортировки материала: некоторые рецепторы претерпевают изменение конформации, освобождаются от лигандов и возвращаются в плазматическую мембрану; другие рецепторы не изменяются при низком рН, сохраняют свои лиганды и разрушаются в лизосоме.
- З. Значение рН внутри эндосомы снижается почти до 5 благодаря действию белка, осуществляющего Na^+/H^+ -обмен. Ионы Na^+ , поступающие в цитоплазму, постепенно удаляются из клетки в результате работы $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насоса, так что подкисление косвенно обеспечивается гидролизом АТФ.
- И. Трансферрин — белок, ответственный за перенос ферритина внутрь клеток.

- К. Рецепторы трансферрина не подвергаются гидролизу в лизосомах, поскольку они устойчивы к протеолизу при низком рН.
- Л. Рецепторы для ФРЭ на поверхности клетки собираются в окаймленных ямках только после связывания с молекулами ФРЭ, тогда как рецепторы ЛНП поступают в такие углубления даже в отсутствие лиганда.
- М. Окаймленные ямки действуют как молекулярные фильтры, собирая определенные белки плазматической мембраны и отсеивая другие белки.
- Н. Важное различие между эндоцитозом, опосредуемым рецепторами, и фагоцитозом состоит в том, что первый идет постоянно и независимо от присутствия лигандов в среде, тогда как второй – только в том случае, если клетка сталкивается с чем-то пригодным для питания.
- О. Поскольку фагоцитоз подавляется цитохалазинами, а эндоцитоз, опосредуемый рецепторами, – нет, по-видимому, именно в фагоцитозе, а не в опосредуемом рецепторами эндоцитозе участвует актин.
- П. Вирусы гриппа, относящиеся к группе вирусов, имеющих оболочку, проникают в клетки в процессе эндоцитоза, опосредуемого рецепторами, и вследствие низкого рН в эндосоме в оболочке вируса активируется особый гликопротеин, индуцирующий слияние мембран.

6-30 Вас интересует экзоцитоз и эндоцитоз в культивируемых клетках печени, которые секретируют альбумин и поглощают трансферрин. Чтобы различить эти два события, следует добавить в среду трансферрин, меченный коллоидным золотом, а затем через несколько минут зафиксировать клетки, после чего приготовить тонкие срезы и обработать их антителами (меченными ферритином) против альбумина. Коллоидное золото и ферритин – вещества высокой электронной плотности и поэтому легко идентифицируются при электронной микроскопии, кроме того, их легко отличить друг от друга по размеру и плотности частиц.

- А. Позволяет ли этот опыт идентифицировать везикулы, относящиеся к механизмам экзо- и эндоцитоза? Каким образом?
- Б. Не все везикулы, меченные золотом, покрыты клатрином. Почему?

6-31 Оборот мембранных рецепторов трансферрина изучали с помощью изотопной метки, которую вводили в рецепторы, расположенные на поверхности клетки, чтобы определить их дальнейшие превращения в условиях инкубации при 0 и 37°C. Интактные клетки обрабатывали радиоактивным иодом при 0°C в условиях, благоприятных для мечения белков клеточной поверхности. Если после этого клетки инкубировали на льду и затем обрабатывали трипсином, который разрушает рецепторные участки, не нарушая целостности клетки, то радиоактивно меченные рецепторы трансферрина полностью разрушались. (Немеченные рецепторы к трансферрину выявлялись как отдельное пятно после разделения клеточных белков путем двумерного электрофореза в полиакриламидном геле.) Если же клетки сначала инкубировали при 37°C в течение 1 ч, а затем обрабатывали трипсином (на льду), то в соответствующем пятне обнаруживалось около 70% первоначальной радиоактивности. Сама по себе инкубация при обеих температурах, судя по результатам электрофореза, не вызывала повреждения большей части рецепторов.

Второй препарат клеток, поверхность которых была помечена

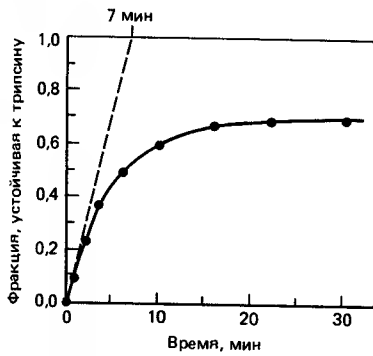


Рис. 6-12. Фракция меченого рецептора трансферрина, устойчивая к трипсину, как функция времени после мечения (задача 6-32). Штриховой линией показана начальная скорость погружения.

при 0°C , а инкубация проведена при 37°C в течение 1 ч, анализировали с помощью антител к трансферрину. Если для реакции использовали интактные клетки, то с антителами связывалось 0,54% меченых белков. Если клетки сначала обрабатывали детергентом, то 1,76% меченых белков оказывались связанными с антителами.

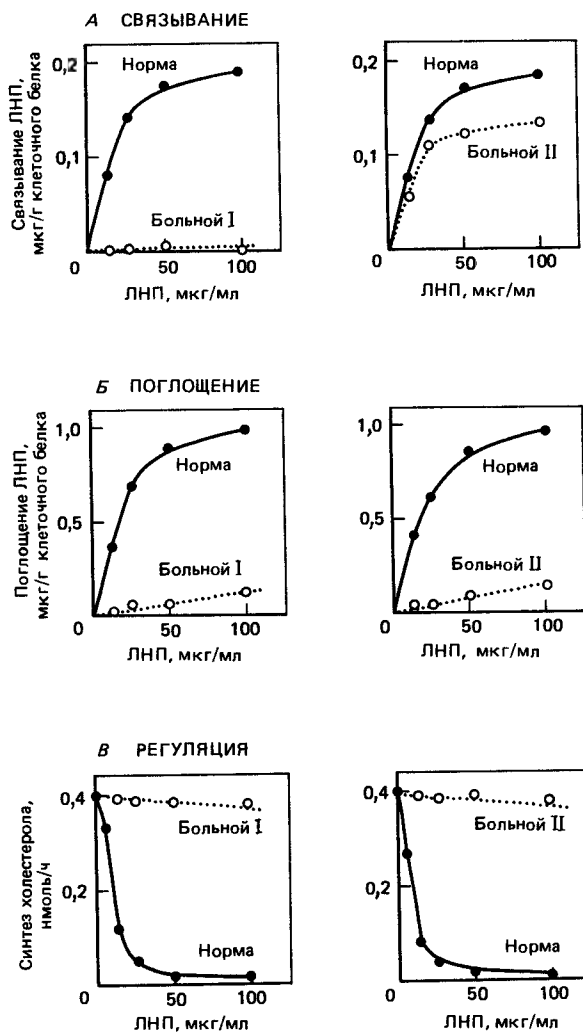
- А. Почему при обработке трипсином разрушаются меченые рецепторы трансферрина (но большая часть рецепторов не повреждается), если клетки выдерживают на льду? Почему меченые рецепторы становятся устойчивыми к трипсину, когда клетки инкубируют при 37°C ?
- Б. Какая доля всех рецепторов трансферрина находится на поверхности клетки после инкубации в течение 1 ч при 37°C ? Согласуются ли результаты этих двух экспериментальных подходов?

6-32 Среднее время, за которое рецепторы трансферрина проходят цикл от поверхности клетки в эндосомы и обратно к поверхности, было определено путем мечения рецепторов на поверхности клетки радиоактивным иодом при 0°C и изучения их дальнейшей судьбы при 37°C . В различные моменты времени после переноса клеток в условия температуры 37°C образцы разбавляли охлажденной до 0°C средой, содержащей трипсин. Количество радиоактивности в рецепторах трансферрина, устойчивых к трипсину, измеряли после их отделения от других компонентов мембран с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле. Результаты представлены на рис. 6-12.

- А. Начальная скорость интернализации (погружения внутрь клетки) меченых рецепторов трансферрина указана штриховой линией. Почему эта скорость снижается со временем?
- Б. Используя начальную скорость интернализации, оцените долю поверхностных рецепторов, которые попадают внутрь клетки за 1 мин.
- В. Какая доля молекул рецептора от всей его популяции попадает внутрь клеток каждую минуту?
- Г. При той скорости этого процесса, которая была определена (пункт В), рассчитайте, сколько потребуется времени для поступления внутрь клеток такого количества рецепторов, которое эквивалентно всей их популяции. Объясните, почему это время совпадает со средним временем, за которое рецептор совершает полный цикл от поверхности в составе эндосом внутрь клетки и обратно к ее поверхности.
- Д. Сколько времени, в среднем, рецептор трансферрина находится на поверхности клетки?

6-33 Холестерол — необходимый компонент плазматической мембраны. Однако у людей с очень высоким содержанием его в крови наблюдается склонность к сердечно-сосудистым заболеваниям. Холестерол транспортируется в виде простых эфиров в составе частиц липопротеинов низкой плотности (ЛНП). Эти частицы связываются со специфическим высокоаффинным рецептором на поверхности клетки, затем через окаймленную ямку попадают внутрь клетки и в конце концов оказываются в лизосомах. Здесь их белковая оболочка разрушается, а эфиры холестерина освобождаются и подвергаются гидролизу. Свободный холестерол выходит в цитоплазму и ингибирует фермент гидроксиметилглутарил-СоА-редуктазу — ключевой фермент в биосинтезе холестерола. Однако у больных с тяжелой гиперхолестеремией липопротеины низкой

Рис. 6-13. Метаболизм ЛНП в клетках здорового человека и в клетках больных с тяжелыми формами наследственной гиперхолестеремии (задача 6-33). **А.** Высокоаффинное поверхностное связывание ЛНП клеткой. **Б.** Поглощение ЛНП клеткой. **В.** Регуляция синтеза холестерина с помощью ЛНП. За связыванием и поглощением ЛНП клеткой следят, используя ЛНП, меченные ферритином (контрастирование для электронной микроскопии), либо ЛНП, меченные радиоактивным йодом (измерение радиоактивности гамма-счетчиком). Связанную на поверхности метку можно извлечь путем отмывания отрицательно заряженными полимерами. Интернализованная метка при этом не извлекается.



плотности не выводятся из крови. В результате в клетках синтез холестерина не прекращается, что ведет к избыточному накоплению его в организме.

Метаболизм ЛНП удобно подразделить на три этапа: связывание ЛНП с клеточной поверхностью, поглощение ЛНП клеткой и регуляция внутриклеточного синтеза холестерина при участии ЛНП. На рис. 6-13 показаны результаты изучения этих процессов на культурах клеток кожи здоровых людей и двух больных наследственной гиперхолестеремией в тяжелой форме.

- А. На рис. 6-13, А сравнивается связывание ЛНП поверхностью клеток здоровых и больных доноров. Почему связывание ЛНП нормальными клетками и клетками больного II достигает насыщения? Как объяснить отсутствие связывания ЛНП клетками больного I?
- Б. На рис. 6-13, Б показано, что включение ЛНП в нормальные клетки возрастает с увеличением концентрации ЛНП во внешней среде, достигая плато на уровне, который в пять раз превышает количество ЛНП, связанных на поверхности клетки. Почему ЛНП не проникают в клетки больных I и II?
- В. На рис. 6-13, В сравнивается зависимость синтеза холестерина от

концентрации ЛНП в клетках здоровых и больных людей. Почему при возрастании концентрации ЛНП во внешней среде синтез холестерина в нормальных клетках подавляется, а в клетках больных не меняется?

Г. Как изменится скорость синтеза холестерина в клетках здорового и больных доноров при инкубации этих клеток со свободным холестерином? (Свободный холестерин проходит через плазматическую мембрану за счет диффузии.)

6-34 Возвращаясь к экспериментальным данным, приведенным в задаче 6-33, вспомним, как обстоит дело с метаболизмом ЛНП у больного II. Его клетки обладали тем же сродством к ЛНП, что и нормальные, и связывали почти то же количество ЛНП, но это связывание не приводило к поглощению последних. Такое нарушение можно объяснить двумя способами:

- 1) рецепторы ЛНП в клетках больного II имеют какой-то дефект в той их части, которая обращена к мембране, так что они не могут проникнуть в клетку, хотя их домены, связывающие ЛНП на поверхности клетки, совершенно нормальны;
- 2) рецепторы ЛНП клеток больного II нормальны, но в результате мутации, затрагивающей механизм проникновения частиц ЛНП внутрь клеток, рецептор с присоединенной к нему частицей ЛНП не может попасть в клетку.

Для выяснения причины нарушения было проведено обследование родителей больного II. Поскольку ген, кодирующий рецептор ЛНП, является аутосомным, каждый из родителей должен был передать один из двух своих генов потомку, больному II. Его мать страдала умеренно повышенным содержанием холестерина в крови. При 4°C ее клетки в культуре связывали вдвое меньше ЛНП, чем нормальные клетки; но после нагревания до 37°C связанные частицы ЛНП оказывались внутри клеток так же быстро, как и у здоровых доноров. У отца больного II также была умеренная гиперхолестеролемиа, но его клетки при 4°C связывали на 50% больше ЛНП, чем нормальные. При 37°C около половины общего количества метки поглощалось клетками с нормальной скоростью, но другая половина в клетки не попадала. В последующем с помощью электронной микроскопии с использованием частиц ЛНП, меченных ферритином, у всех членов этой семьи исследовали связь между расположением клеточных рецепторов ЛНП и окаймленными ямками. Результаты исследования представлены в табл. 6-7.

А. Почему у матери больного II была умеренная гиперхолестеролемиа? Какой ген рецептора ЛНП она передала своему сыну?

Таблица 6-7. Распределение рецепторов ЛНП на поверхности клеток больного II, его родителей и здоровых доноров (задача 6-34)

	Количество рецепторов ЛНП	
	В окаймленных ямках	Вне окаймленных ямок
Здоровый мужчина	186	195
Здоровая женщина	186	165
Больной II	10	342
Отец больного II	112	444
Мать больного II	91	87

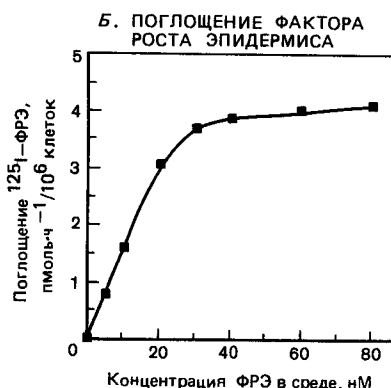


Рис. 6-14. Поглощение клеткой пероксидазы хрена (ПХ) и фактора роста эпидермиса (ФРЭ) в зависимости от их концентрации в среде (задача 6-35).

- Б. Почему у отца больного II наблюдалась умеренная гиперхолестеролемиа? Можно ли привести довод в пользу объяснения 1 либо 2 (см. выше), опираясь на тот факт, что клетки отца больного II оказались не способны поглощать *все* связанные на их поверхности ЛНП?
- В. Можно ли объяснить гиперхолестеролемию у больного II на основании поведения рецепторов ЛНП на поверхности клеток у его родителей?
- Г. Какое нарушение в поглощении ЛНП клетками больного II вытекает из анализа данных электронной микроскопии?

6-35 Клетки поглощают внеклеточные молекулы с помощью эндоцитоза, опосредуемого рецепторами, либо жидкофазного эндоцитоза. Соотношение эффективностей этих двух путей было исследовано на культуре клеток эпителиальной карциномы; чтобы количественно охарактеризовать эндоцитоз, опосредуемый рецептором, эти клетки инкубировали с фактором роста эпидермиса (ФРЭ), а для измерения жидкофазного эндоцитоза – с пероксидазой хрена (ПХ). Для анализа поглощения этих соединений использовали ФРЭ, меченный ферритином, в концентрации 40 нМ и ПХ – в концентрации 20 мкМ, т.е. в 500 раз большей, чем концентрация ФРЭ. После различных периодов инкубации клетки фиксировали, а затем определяли в них ПХ (по цветной реакции) и наличие ферритина в везикулах. Оказалось, что ФРЭ и ПХ находятся внутри мелких везикул с внутренним радиусом 20 нм, причем везикул с ФРЭ было гораздо больше, чем везикул с ПХ.

Скорости поглощения ФРЭ и ПХ клетками оценивали по кривым, представленным на рис. 6-14. Поглощение ПХ было пропорциональным длительности инкубации и концентрации вещества, составляя 1 пмоль/ч при концентрации ПХ 20 мкМ (рис. 6-14, А). Поглощение ФРЭ клетками вначале было линейным, а при больших концентрациях в среде достигало плато (рис. 6-14, Б).

- А. Объясните, почему формы кривых на рис. 6-14 для ФРЭ и ПХ различаются?
- Б. Рассчитайте количество рецепторов на поверхности клетки.
- В. Рассчитайте, сколько молекул ПХ захватывается каждым эндоцитозным пузырьком (с радиусом 20 нм), если содержание ПХ в среде составляет 1 мг/мл (молекулярная масса 40 000). (Объем шара равен $4/3\pi r^3$).
- Г. Ученые, проделавшие описанные выше эксперименты, писали: «Эти расчеты ясно показывают, как клетки могут путем эндоцитоза поглощать ФРЭ практически без примесей, за исключением ничтожных количеств внеклеточной жидкости». Объясните, что они имели в виду.

Преобразование энергии: митохондрии и хлоропласты

Митохондрии (МБК 7.1)

7-1 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Внутренняя и наружная мембраны митохондрий разделяют два митохондриальных компартмента: внутреннюю область _____ и гораздо более узкое _____.
- Б. _____ мембрана митохондрий напоминает сито, проницаемое для любых молекул, в том числе для небольших белков с молекулярной массой менее 10 000 Да.
- В. Ферменты _____ погружены в _____ мембрану митохондрий; они необходимы для процесса окислительного фосфорилирования, в результате которого образуется большая часть АТФ в животных клетках.
- Г. Внутренняя мембрана обычно складчатая; она образует ряд перегородок, называемых _____, за счет которых поверхность внутренней мембраны существенно увеличивается.
- Д. _____, которые построены из трех молекул жирных кислот, соединенных эфирными связями с глицеролом, не несут заряда и фактически нерастворимы в воде; в цитозоле они сливаются в отдельные капельки.
- Е. Крупный разветвленный полимер глюкозы, который присутствует в цитоплазме в виде гранул, известен под названием _____.
- Ж. В _____ обычно окисляется около 2/3 общего количества окисляемых в клетках углеродсодержащих веществ; основными конечными продуктами при этом являются CO_2 и NADH .
- З. При переносе электронов от молекул NADH и FADH_2 на кислород освобождается большое количество энергии, которая используется для превращения ADP и неорганического фосфата в ATP в процессе _____.
- И. Энергия, освобождающаяся при переносе электронов по дыхательной цепи, запасается в форме _____ на внутренней митохондриальной мембране.
- К. Поток электронов через внутреннюю мембрану генерирует градиент pH и мембранный потенциал, которые вместе создают _____ силу.
- Л. _____ синтезирует ATP из ADP и неорганического фосфата в матриксе митохондрии в реакции, сопряженной с транспортом протонов внутрь митохондрий.

7-2 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Благодаря многим специализированным транспортным белкам, имеющимся во внутренней и наружной мембранах, межмембранное пространство и пространство матрикса по содержанию низкомолекулярных соединений химически эквивалентны цитозолу.

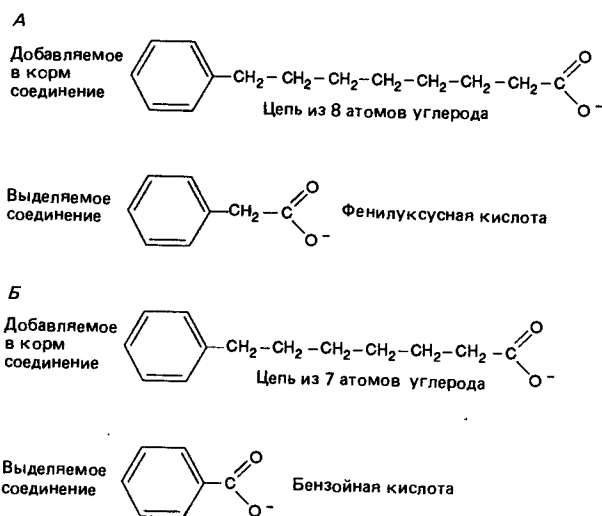
- Б. Количество крист в митохондриях клеток сердечной мышцы втрое больше, чем в митохондриях клеток печени, что, по-видимому, отражает большую потребность клеток сердца в АТР.
- В. Чтобы обеспечить непрерывное получение энергии за счет окислительного метаболизма, животные клетки хранят «горючее» в форме жирных кислот и глюкозы.
- Г. Наиболее важный вклад цикла лимонной кислоты в метаболизм заключается в извлечении высокоэнергетических электронов при окислении двух углеродных атомов ацетильной группы до CO_2 .
- Д. Энергия, выделяющаяся при транспорте электронов по дыхательной цепи во внутренней мембране митохондрий, используется для перекачивания протонов через мембрану из межмембранного пространства в матрикс.
- Е. Каждый последующий комплекс дыхательных ферментов в цепи переноса электронов обладает большим сродством к электронам, чем предыдущий; электроны последовательно переходят от одного комплекса к другому, пока в конечном итоге не достигнут кислорода, который обладает наибольшим по сравнению со всеми комплексами сродством к электронам.
- Ж. Как правило, протондвижущая сила во внутренней мембране дышащей митохондрии почти на три четверти обусловлена мембранным потенциалом.
- З. Расположение АТР-синтетазы во внутренней мембране митохондрии таково, что АТР образуется в межмембранном пространстве; отсюда АТР диффундирует в цитозоль через поры в наружной мембране.
- И. Полное изменение энтропии в результате какой-либо химической реакции выражается в изменении свободной энергии, сопровождающей эту реакцию: чем больше увеличение свободной энергии (когда ΔG становится большой положительной величиной), тем легче идет данная реакция.
- К. Значительная эффективность клеточного дыхания обусловлена главным образом большим числом образующихся в процессе окисления промежуточных продуктов (интермедиатов), благодаря чему огромное количество свободной энергии, освобождающейся при окислении, дробится на небольшие порции.

7-3 В 1904 г. Франц Кноп впервые успешно применил меченые соединения для изучения путей метаболизма. Он добавлял в корм собакам жирные кислоты, меченные терминальным бензольным кольцом, и анализировал выделение производных бензола с мочой. Всякий раз, когда жирная кислота содержала четное число атомов углерода, выделялась фенилуксусная кислота (рис. 7-1, А). Если в молекуле жирной кислоты было нечетное число атомов углерода, то выделялась бензойная кислота (рис. 7-1, Б). (В действительности в обоих экспериментах выделяемые соединения были этерифицированы сахаром, что повышало их растворимость, не влияя на метаболизм жирных кислот.)

На основании своих опытов Кноп сделал вывод, что окисление жирных кислот до CO_2 и H_2O включает отщепление двууглеродных фрагментов от карбоксильного конца углеводородной цепи. Можете ли вы объяснить, почему Кноп сделал вывод о том, что отделялись двууглеродные фрагменты, а не фрагменты с другим числом атомов С, и что отщепление происходило с карбоксильного конца, а не с противоположного?

7-4 В 1937 г. Ханс Кребс объяснил функционирование цикла лимонной

Рис. 7-1. Добавляемые в корм и выделяемые соединения в случаях четного (А) и нечетного (Б) числа атомов углерода в цепи жирной кислоты (задача 7-3).



кислоты, подробно изучив окисление углеродсодержащих веществ в препаратах измельченных летательных мышц голубя. (В таких препаратах содержится много митохондрий, однако в то время функция последних была еще неизвестна.) Поглощение O_2 и выделение CO_2 Кребс определял с помощью манометра, который позволял следить за изменениями объема газовой фазы в замкнутой системе при постоянных давлении и температуре. Для определения концентраций ключевых метаболитов были использованы стандартные химические методы (радиоизотопных методов тогда еще не существовало).

В одной серии опытов Кребс измерял скорость поглощения O_2 при окислении эндогенных углеводов в присутствии или в отсутствие цитрата. Как видно из табл. 7-1, добавление небольших количеств цитрата приводило к значительному увеличению поглощения кислорода. До этого Сент-Дьерди (1925 г.), а также Стар и Бауман (1936 г.) показали, что фумарат, оксалоацетат и сукцинат тоже стимулируют дыхание в экстрактах грудных мышц голубя.

Таблица 7-1. Дыхание в препарате измельченной грудной мышцы голубя в присутствии и в отсутствие цитрата (задача 7-4)

Время, мин	Потребление кислорода, ммоль		
	В отсутствие цитрата	3 ммоль цитрата	Разность
30	29	31	2
60	47	68	21
90	51	87	36
150	53	93	40

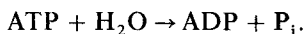
Когда к измельченным мышцам добавляли метаболитические яды, например арсенит или малонат (механизмы действия которых не были еще известны), получаемые результаты зависели от вида яда. В присутствии арсенита 5,5 ммоль цитрата превращались в почти 5,5 ммоль α -кетоглутарата. В присутствии малоната происходило эквивалентное превращение цитрата в сукцинат.

В последнем случае потребление O_2 составляло приблизительно 5 ммоль кислорода сверх фонового поглощения (в отсутствие цитрата), что вдвое превышало потребление кислорода в присутствии арсенита.

И наконец, Кребс показал, что измельченные мышцы действительно синтезировали лимонную кислоту, если была добавлена щавелевоуксусная кислота и в среде полностью отсутствовал кислород. Ни одно другое промежуточное соединение этого цикла не обеспечивало истинного синтеза лимонной кислоты в отсутствие кислорода.

- А. Если бы лимонная кислота ($C_6H_8O_7$) полностью окислялась до CO_2 и H_2O , то сколько молекул O_2 на молекулу кислоты понадобилось бы для этого? О чем говорят результаты опытов (табл. 7-1), привлекая внимание Кребса?
- Б. Почему в присутствии арсенита и малоната потребление кислорода было таким низким? Если бы лимонная кислота окислялась до α -кетоглутаровой кислоты ($C_5H_6O_5$), то сколько кислорода требовалось бы в расчете на один моль лимонной кислоты? Если бы она окислялась до янтарной кислоты, то сколько кислорода потребовалось бы для окисления одного моля лимонной кислоты? Согласуется ли наблюдаемая стехиометрия реакции окисления с ожидаемой расчетной?
- В. Почему в отсутствие кислорода добавление только щавелевоуксусной кислоты вызывало накопление лимонной кислоты? Мог бы какой-либо другой промежуточный продукт цикла обеспечить накопление лимонной кислоты в присутствии кислорода?
- Г. В конце своей статьи Кребс писал: «Таким образом, цикл лимонной кислоты, по-видимому, присущ животным тканям, но отсутствует у дрожжей и у бактерии *E. coli*, судя по тому, что ни дрожжи, ни *E. coli* не окисляют лимонную кислоту со сколько-нибудь заметной скоростью». Почему, как вы думаете, Кребс ошибался в этом вопросе?

- 7-5 Соотношение между изменением свободной энергии (ΔG) и концентрациями реагирующих веществ и продуктов реакции имеет большое значение, поскольку от него зависит направление спонтанных химических реакций. Представление об этом соотношении необходимо для понимания превращений энергии в клетках. Рассмотрим, например, гидролиз АТФ до АДФ и неорганического фосфата (P_i):



Изменение свободной энергии при гидролизе АТФ выражается следующим уравнением:

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln [ADP][P_i]/[ATP] = \Delta G^0 + 2,3RT \log_{10} [ADP][P_i]/[ATP],$$

где концентрации выражены в молях (по условию, концентрации воды не включаются в это уравнение). R —газовая постоянная, $1,98 \times 10^{-3}$ ккал/К $\times$ моль; T —температура по шкале Кельвина (например, при $37^\circ C$ $T = 310$ К); ΔG^0 —изменение стандартной свободной энергии ($-7,3$ ккал/моль для гидролиза АТФ до АДФ и P_i).

- А. Рассчитайте ΔG для гидролиза АТФ, приняв, что концентрации АТФ, АДФ и P_i равны 1 М. Какова будет величина ΔG , если эти концентрации будут равны 1 мМ?
- Б. В покоящейся мышце концентрации АТФ, АДФ и P_i равны пример

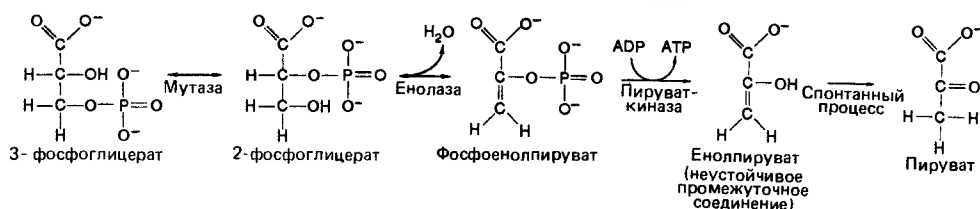


Рис. 7-2. Превращение 3-фосфоглицерата в пируват при гликолизе (задача 7-6).

но 5, 1 и 10 мМ соответственно. Какова величина ΔG для гидролиза АТФ в этом случае?

- В. Чему будет равна величина ΔG , когда реакция гидролиза достигнет равновесия? Каким будет отношение $[ATP] : [ADP]$ при равновесии, если $[P_i] = 10$ мМ?
- Г. Покажите, что при постоянной концентрации P_i величина ΔG будет снижаться на 1,4 ккал/моль при каждом десятикратном увеличении отношения $[ATP]/[ADP]$ независимо от величины ΔG^0 (например, ΔG уменьшается на 2,8 ккал/моль при 100-кратном изменении этого отношения; на 4,2 ккал/моль при 1000-кратном изменении и т. д.)

- 7-6 Одна из двух стадий гликолиза, на которых образуется АТФ, представлена на рис. 7-2. В ходе этих реакций образуются АТФ и пируват, который затем превращается в ацетил-СоА и окисляется до CO_2 в цикле лимонной кислоты. В анаэробных условиях из фосфоенолпирувата образуется половина необходимого для клетки количества АТФ. Эти реакции субстратного фосфорилирования, названного так для того, чтобы отличать его от окислительного фосфорилирования в митохондриях, следует разобрать в первую очередь. Рассмотрим превращение 3-фосфоглицерата в фосфоенолпируват (две первые реакции на рис. 7-2). Уравнение, связывающее ΔG^0 с константой равновесия, записывается таким образом:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K = -2,3RT \log_{10} K,$$

где K – отношение концентраций продуктов к концентрациям реагирующих веществ при равновесии.

- А. Если 10 мМ 3-фосфоглицерата смешать с фосфоглицеромутазой, катализирующей превращение этой кислоты в 2-фосфоглицерат (рис. 7-2), то при 37°C равновесная концентрация 3-фосфоглицерата станет равной 8,3 мМ, а 2-фосфоглицерата – 1,7 мМ. Как изменились бы равновесные концентрации, если бы первоначально внесли 1 М 3-фосфоглицерата? Какова константа равновесия (K) для превращения 3-фосфоглицерата в 2-фосфоглицерат и какова величина ΔG^0 для этой реакции?
- Б. Если смешать 10 мМ фосфоенолпирувата с енолазой, катализирующей ее превращение в 2-фосфоглицерат, то при 37°C равновесные концентрации 2-фосфоглицерата и фосфоенолпирувата составят 2,9 и 7,1 мМ соответственно. Чему равно ΔG^0 при превращении фосфоенолпирувата в 2-фосфоглицерат? Каково значение ΔG^0 при обратной реакции?
- В. Каково значение ΔG^0 при превращении 3-фосфоглицерата в фосфоенолпируват (ΔG^0 для всей реакции равно сумме значений ΔG^0 для последовательных реакций.)

- 7-7 Изучение реакций субстратного фосфорилирования, показанных на рис. 7-2, привело к созданию концепции макроэргической фосфатной связи. Этот термин может ввести в заблуждение, поскольку он означает не силу связи, а лишь изменение свободной энергии

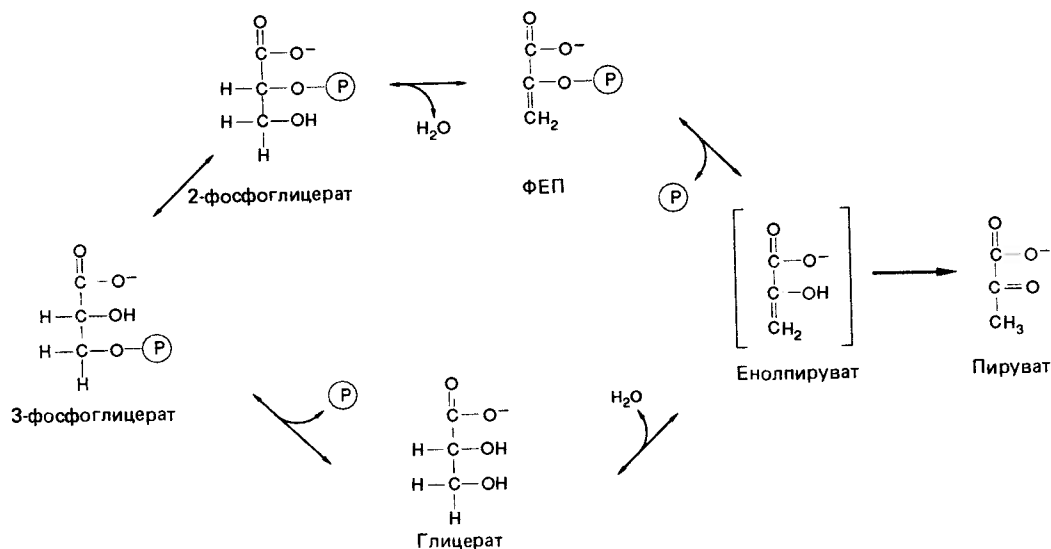


Рис. 7-3. Превращение 3-фосфоглицерата в пируват двумя различными путями (задача 7-7). Фосфатная группа обозначена буквой Р в кружке. Вещество, указанное в квадратных скобках, — енолпируват — неустойчивое промежуточное соединение.

(ΔG) при гидролизе этой связи. При превращении 3-фосфоглицерата в фосфоенолпируват (две первые реакции на рис. 7-2) фосфатная связь с низкой энергией превращается в фосфатную связь с высокой энергией. Изменение стандартной свободной энергии (ΔG^0) при отщеплении фосфатной группы от фосфоглицерата при участии воды составляет $-3,3$ ккал/моль, а при отщеплении фосфата от фосфоенолпирувата (с превращением ее в пируват) оно равно $-14,8$ ккал/моль.

Почему перемещение фосфатной группы в положение 2 в молекуле глицерата с отщеплением при этом одной молекулы воды, сопровождающееся изменением стандартной свободной энергии всего на $0,4$ ккал/моль, так сильно влияет на количество свободной энергии, высвобождающееся при последующем гидролизе фосфатной связи?

Рассмотрим реакции, представленные на рис. 7-3.

- А. Какова величина ΔG^0 для превращения 3-фосфоглицерата в пируват через фосфоенолпируват (ФЕП)? (Вспомните, что ΔG^0 для всей реакции является суммой величин ΔG^0 для ее отдельных ступеней.)
- Б. Какова величина ΔG^0 для превращения 3-фосфоглицерата в пируват через глицерат? Чему равна величина ΔG^0 для превращения глицерата в пируват? (Нужно помнить, что термодинамические величины являются функциями состояния, т.е. они описывают разницу между начальным и конечным состояниями и не зависят от пути перехода от одного состояния к другому.)
- В. Попробуйте объяснить, почему фосфатная связь в фосфоенолпирувате является макроэргической, а в 3-фосфоглицерате — микроэргической. (Считайте, что изменение стандартной свободной энергии ΔG^0 при отщеплении воды от глицерата составляет $-0,5$ ккал/моль.)
- Г. Как показано на рис. 7-2, превращение в клетках фосфоенолпирувата в пируват сопряжено с синтезом АТФ. Какова величина ΔG для этих сопряженных реакций?

7-8 АДФ/АТФ-транслоказа, осуществляющая перенос по механизму антипорта, локализована во внутренней митохондриальной мембране. Она может обменивать АТФ на АДФ, АДФ на АТФ, АДФ на АДФ. Хотя в митохондриях возможен транспорт и АДФ, и АТФ

в фосфорилирующих условиях преимущественно происходит обмен: $ADP_{\text{наруж}} - ATP_{\text{внутр}}$. Вы предполагаете, что это обусловлено превращением ADP в ATP внутри митохондрий. В результате образования ATP концентрация ADP внутри митохондрий должна постоянно снижаться и тем самым должен создаваться концентрационный градиент, способствующий поступлению ADP в митохондрии. Тот же процесс должен приводить к увеличению внутри митохондрий концентрации ATP , создавая соответствующие условия для выхода ATP .

Чтобы проверить справедливость своей гипотезы, вы ставите опыты на изолированных митохондриях. В отсутствие субстрата (когда митохондрии не дышат и потенциала на их мембране нет) вы обнаруживаете, что ADP и ATP поглощаются с одинаковой скоростью. При добавлении субстрата митохондрии начинают дышать (поглощать кислород) и ADP поступает в них гораздо быстрее, чем ATP . Как и предполагалось, когда вы добавляете вместе с субстратом разобщитель (динитрофенол), который разрушает градиент pH , ADP и ATP входят с одинаковой скоростью. Однако когда вы добавляете в присутствии субстрата ингибитор ATP -синтетазы, олигомицин, ADP поглощается гораздо быстрее, чем ATP . Ваши результаты представлены в табл. 7-2. Вы озадачены результатом опыта с олигомицином, так как по вашей гипотезе скорости поглощения должны быть одинаковыми.

Таблица 7-2. Поступление ADP и ATP в изолированные митохондрии (задача 7-8)

Опыт	Субстрат	Ингибитор	Относительная скорость поступления
1	Отсутствует	Нет	$ADP = ATP$
2	Присутствует	Нет	$ADP > ATP$
3	Присутствует	Динитрофенол	$ADP = ATP$
4	Присутствует	Олигомицин	$ADP > ATP$

Примечание: во всех случаях измеряли начальные скорости поступления ADP и ATP .

Когда вы показываете эти результаты руководителю, он хвалит вас за тонкие эксперименты и, соглашаясь, что они не подтверждают гипотезу, предлагает проанализировать структуру ATP и ADP (рис. 7-4), для того чтобы понять поведение переносчика. В чем заключается правильное объяснение сдвига в обмене $ADP - ATP$, осуществляемом переносчиком, в одних экспериментальных условиях и эквивалентного обмена при других условиях?

Дыхательная цепь и ATP -синтетаза (МБК 7.2)

7-9 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- Белок F_1 - ATP азы представляет собой часть крупного трансмембранного комплекса, содержащего по крайней мере девять различных полипептидных цепей и называемого теперь _____.
- Различные _____ составляют группу окрашенных белков, объединяемых по признаку присутствия в молекуле связанного с белком гема. Атом железа в составе гема переходит из трехвалентной формы в двухвалентную, когда принимает электрон.

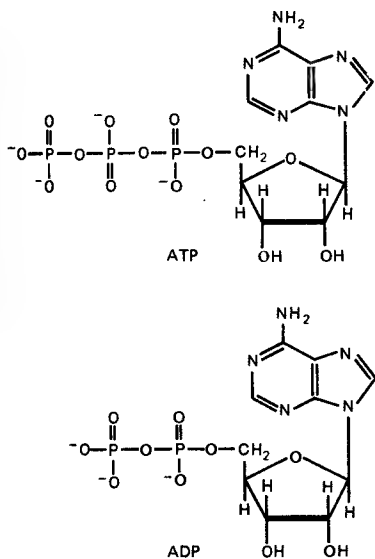


Рис. 7-4. Структуры ATP и ADP (задача 7-8).

- В. Белки, относящиеся ко второму большому семейству переносчиков электронов, содержат два или четыре атома железа, которые связаны с равным количеством атомов серы и равным числом остатков цистеина, образуя _____ в молекулах этих белков.
- Г. Самый простой из всех переносчиков электронов — это низкомолекулярное гидрофобное соединение убихинон, который, как и другие _____, может принять или отдать один или сразу два электрона.
- Д. Применение мягких ионных детергентов, которые сольбилизируют отдельные компоненты внутренней мембраны митохондрий в нативной форме, позволило идентифицировать и очистить три главных, связанных с мембраной _____, функционирующих на пути транспорта электронов от NADH до кислорода.
- Е. _____ принимает электроны от NADH и передает их через флавин и по крайней мере пять железосерных комплексов к убихинону.
- Ж. _____ принимает электроны от убихинона и передает их на цитохром *c*.
- З. _____ принимает электроны от цитохрома *c* и переносит их на кислород.
- И. Пары соединений, такие, как NADH и NAD^+ , называют _____, так как одно из веществ превращается в другое за счет присоединения одного или более электронов плюс одного или более протонов.
- К. В смеси NADH и NAD^+ в соотношении 1:1 поддерживается определенное «давление электронов», или _____, который служит мерой сродства переносчика к электронам.
- Л. Прямое ингибирующее влияние электрохимического протонного градиента на транспорт электронов называется _____.
- 7-10** Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.
- А. Получение субмитохондриальных частиц, представляющих собой вывернутые наизнанку и замкнутые участки внутренней мембраны, — это важный момент в анализе белков, ответственных за окислительное фосфорилирование, поскольку на этих частицах легко изучать действие различных не проникающих через мембрану метаболитов, которые обычно присутствуют во внутреннем матриксе интактных митохондрий.
- Б. Если в состав липидных везикул ввести АТФ-синтетазу и бактериородопсин, выполняющий функции светозависимой протонной помпы, то при экспозиции таких везикул на свету в них будет образовываться АТФ.
- В. Очищенная АТФ-синтетаза гидролизует АТФ до ADP и P_i , но в нативной, связанной с митохондриальной мембраной форме она действует только в направлении синтеза АТФ.
- Г. Если поток протонов через АТФ-синтетазу заблокирован, то введение в анаэробный препарат субмитохондриальных частиц небольшого количества кислорода приведет к «вспышке» дыхания и подщелочению среды.
- Д. Все белки, образующие дыхательную цепь, содержат атомы железа, которые служат переносчиками электронов.
- Е. Токсичность таких ядов, как цианид и азид, обусловлена их способностью прочно связываться с комплексом цитохромоксидазы и блокировать тем самым весь процесс транспорта электронов.
- Ж. Три дыхательных ферментных комплекса расположены в плоскости внутренней мембраны в виде пространственно упорядочен

ной последовательности белков, чем обеспечивается последовательный перенос электронов между соответствующими комплексами.

- 3. Поскольку большинство цитохромов имеют более высокий окислительно-восстановительный потенциал, чем железо-серные центры, то цитохромы функционируют как переносчики электронов в основном вблизи O_2 -конца дыхательной цепи.
- И. Молекулярные механизмы сопряжения электронного транспорта с протонной помпой, вероятно, неодинаковы для разных комплексов дыхательных ферментов.
- К. Слабые липофильные кислоты создают ток протонов через внутреннюю мембрану, разрушая тем самым протондвижущую силу, останавливая синтез АТФ и блокируя поток электронов.
- Л. Если на внутренней мембране существует очень большой электрохимический градиент, то в некоторых участках дыхательной цепи можно обнаружить обратный транспорт электронов.
- М. В клетках бурого жира дыхание митохондрий обычно не сопряжено с синтезом АТФ, и энергия окисления выделяется в виде тепла.
- Н. У большинства бактерий, включая облигатных анаэробов, поддерживается протондвижущая сила на плазматической мембране. Она используется в механизме движения жгутиков и процессах активного транспорта.

7-11 Электрохимический протонный градиент несомненно служит источником энергии для синтеза АТФ при окислительном фосфорилировании, однако молекулярный механизм сопряжения этого градиента с синтезом АТФ еще не выяснен. Возникает вопрос: синтезируется ли АТФ непосредственно из АДФ и неорганического фосфата или источником этого фосфата служит какой-то интермедиат, например фосфофермент или другое фосфорилированное соединение?

В одном изящном исследовании анализировали стереохимию механизма реакции. Как это часто делается, для того чтобы понять прямую реакцию, изучали обратную - реакцию гидролиза АТФ до АДФ и фосфата. (Основной принцип ферментативного катализа заключается в том, что прямая и обратная реакции в точности обратны одна другой.) Все ферментативные переносы фосфата происходят с инверсией конфигурации относительно атома фосфора; таким образом, одноступенчатые механизмы, в которых остаток фосфорной кислоты переносится непосредственно между субстратами, приводят к инверсии конечного продукта (рис. 7-5, А).

Рис. 7-5. Стереохимия реакций переноса фосфата (задача 7-11). А. Инверсия конфигурации при одноступенчатой реакции переноса фосфата. Б. Схема эксперимента по выяснению стереохимии синтеза АТФ АТФ-синтетазой. Связи, обозначенные тонкими линиями, лежат в плоскости рисунка; связи, обозначенные широкими незакрашенными треугольниками, лежат над плоскостью рисунка; связи, обозначенные широкими черными треугольниками, - ниже этой плоскости. Атомы кислорода обозначены кружками, в которых указаны их атомные числа (16, 17 и 18).

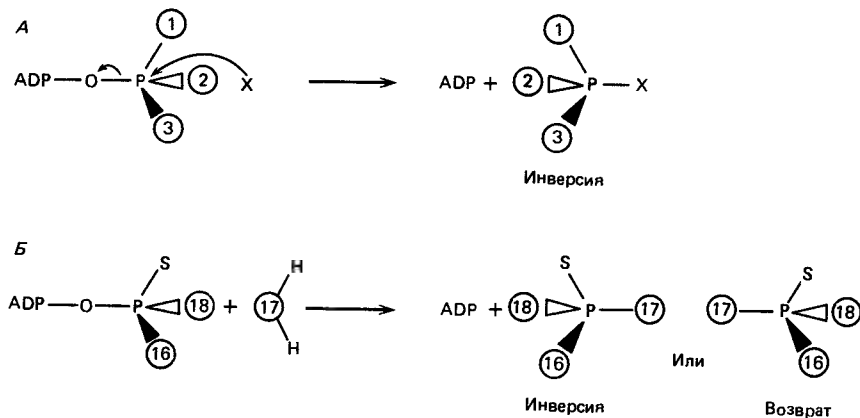


Рис. 7-6. Полосы поглощения цитохромов (задача 7-12). Числа означают длины волн в нм.



Для изучения стереохимии гидролиза АТФ исследователи синтезировали производное АТФ, в котором три атома (S, ^{16}O и ^{18}O) были специфическим (в пространственном отношении) образом соединены с концевым атомом фосфора (рис. 7-5, Б). Это соединение было затем подвергнуто гидролизу до АДФ и неорганического фосфата с помощью очищенного препарата АТФ-синтетазы в присутствии воды, обогащенной изотопом ^{17}O . Выделяющийся фосфат анализировали методом ЯМР для выяснения того, произошла ли инверсия конфигурации относительно атома фосфора или нет? (рис. 7-5, Б).

- А. Каким образом с помощью этого эксперимента можно установить, происходит синтез АТФ непосредственно из АДФ и фосфата или при участии промежуточного фосфорилированного соединения?
- Б. Этот опыт показал, что произошла инверсия конфигурации. Подтверждает ли такой результат предположение о прямом синтезе АТФ или он указывает на участие промежуточного фосфорилированного соединения?

7-12 В 1925 г. Дэвид Кейлин применил простой спектроскоп для наблюдения характерных полос поглощения цитохромов, входящих в состав электронтранспортной цепи митохондрий. В спектроскопе очень яркий белый свет проходит через изучаемый образец, а затем разлагается призмой. При этом выявляются изменения в спектре, вызванные образцом. Если в последнем присутствуют молекулы, поглощающие свет определенной длины волны, то в соответствующем месте спектра обнаружится темная полоса. Кейлин установил, что ткани самых разных животных характеризуются одинаковым спектром поглощения цитохромов (рис. 7-6). (Вообще говоря, этот спектр впервые за несколько десятилетий до этого наблюдал ирландский врач Мак-Манн. Однако он думал, что все полосы поглощения относятся к одному пигменту. К 1920-м годам эта работа была забыта.)

На основании различий в термостабильности отдельных полос поглощения, а также различий в их интенсивности в разных тканях Кейлин заключил, что поглощение определяется тремя компонентами, которые он назвал цитохромами *a*, *b* и *c* (рис. 7-6). Главное его открытие состояло в том, что полосы поглощения исчезают при введении в систему кислорода (рис. 7-7, А), а затем снова появляются, когда условия меняются на анаэробные (рис. 7-7, Б). Позже Кейлин признавался: «Видимое проявление внутриклеточного дыхательного процесса было одним из самых впечатляющих зрелищ, которые мне приходилось наблюдать в ходе работы».

Кейлин обнаружил также, что цианид предотвращает исчезновение полос поглощения после введения кислорода (рис. 7-7, В). Если в систему был добавлен уретан (ингибитор транспорта электронов, в настоящее время не используемый), то полосы *a* и *c* исчезали в присутствии кислорода, но полоса *b* оставалась (рис. 7-7, Г). Наконец, используя цитохром *c*, экстрагированный

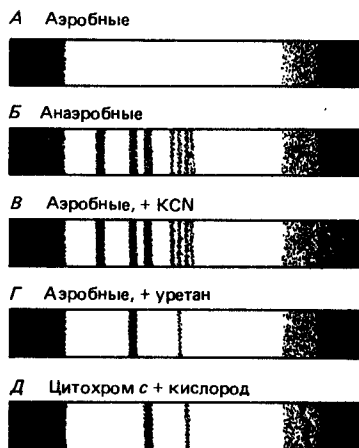
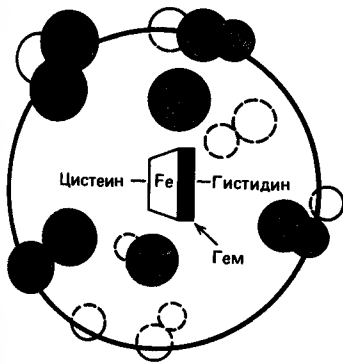


Рис. 7-7. Полосы поглощения цитохромов при разных экспериментальных условиях (задача 7-12).

А От комплекса $b-c_1$

 Лизины, влияющие на перенос электронов от комплекса $b-c_1$ на цитохром c

Б К комплексу цитохромоксидазы

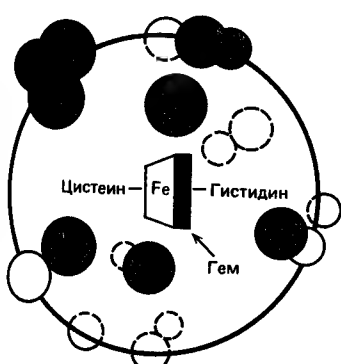

 Лизины, влияющие на перенос электронов от цитохрома c к комплексу $b-c_1$

Рис. 7-8. Положения лизинов, при которых ингибируется перенос электронов: от комплекса $b-c_1$ к цитохрому c (А) и от цитохрома c к комплексу цитохромоксидазы (Б) (задача 7-13). Один край гемовой группы выступает перпендикулярно поверхности молекулы цитохрома c по направлению к читателю. Кружками показано положение лизинов. Сплошные кружки находятся на передней поверхности молекулы, штриховые — на ее задней поверхности. Более крупные по размеру кружки — ближе к наблюдателю. Серые кружки изображают лизины, связанные с ингибированием переноса электронов; светлые — лизины, не связанные с ингибированием этого процесса.

водой из высушенных дрожжей, Кейлин показал, что полоса, обусловленная цитохромом c , сохраняется в присутствии кислорода (рис. 7-7, Д).

- Какая из форм цитохромов, восстановленная (богатая электронами) или окисленная (бедная электронами), дает спектральные полосы, наблюдавшиеся Кейлином?
- Попробуйте на основе наблюдений Кейлина выстроить ряд из трех цитохромов, по которому электроны переносятся от внутриклеточных субстратов к кислороду.
- Одно из ранних наблюдений Кейлина заключалось в том, что в присутствии избытка глюкозы исчезновения полос поглощения при добавлении кислорода в среду не происходит. Можно ли объяснить этот факт быстрым окислением глюкозы до CO_2 ?

7-13 В процессе работы дыхательной цепи цитохром c принимает электроны от комплекса $b-c_1$ и переносит их к комплексу цитохромоксидазы. Какова взаимосвязь цитохрома c с двумя комплексами, которые он соединяет? Связан ли цитохром c с обоими комплексами одновременно, выполняя роль проволоки, проводящей электроны от одного комплекса к другому, или же цитохром c движется между комплексами подобно парому, переправляя электроны от одного к другому? Некоторые данные по этому вопросу были получены в опытах, описываемых ниже.

Была проведена модификация отдельных остатков лизина на поверхности молекулы цитохрома c таким образом, чтобы положительно заряженная аминогруппа была замещена нейтральной либо отрицательно заряженной, и проанализировано влияние таких модификаций на транспорт электронов от комплекса $b-c_1$ к цитохрому c и от цитохрома c к комплексу цитохромоксидазы. Некоторые модификации не влияли на транспорт электронов (рис. 7-8, светлые кружки), тогда как другие ингибировали его на этапе переноса от комплекса $b-c_1$ на цитохром c (рис. 7-8, А, кружки серого цвета) либо от цитохрома c к комплексу цитохромоксидазы (рис. 7-8, Б, кружки серого цвета). В другой серии опытов было показано, что несколько остатков лизина, за счет которых ингибировался перенос электронов к или от цитохрома c , были защищены от ацетилирования, если цитохром c был связан либо с комплексом $b-c_1$, либо с комплексом цитохромоксидазы. Каким образом по этим результатам можно определить характер взаимодействия цитохрома c с двумя комплексами: связывается ли он с ними одновременно или же совершает челночные перемещения между ними?

7-14 Сколько молекул АТФ образуется из АДФ и фосфата, когда пара электронов проходит по электронтранспортной цепи от NADH до кислорода? Целое это число или нет? На эти казались бы простые вопросы трудно ответить на основании чисто теоретических рассуждений, и ответ на них был получен путем прямого измерения дыхания с помощью кислородного электрода (рис. 7-9). Суспензию митохондрий добавляли в указанный момент времени в раствор, содержащий фосфатный буфер и β -гидроксипутират, который может окисляться митохондриями с образованием $NADH + H^+$. Скорость дыхания резко возрастала, затем поглощение кислорода замедлялось и выходило на фоновый уровень. После стабилизации дыхания в среду добавляли 500 нмоль АДФ; это вновь вызывало резкое увеличение скорости поглощения кислорода, пока весь АДФ не превращался в АТФ. Начиная с этого момента скорость погло-

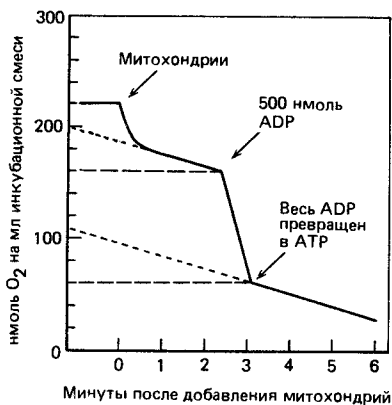


Рис. 7-9. Потребление кислорода митохондриями при разных экспериментальных условиях (задача 7-14).

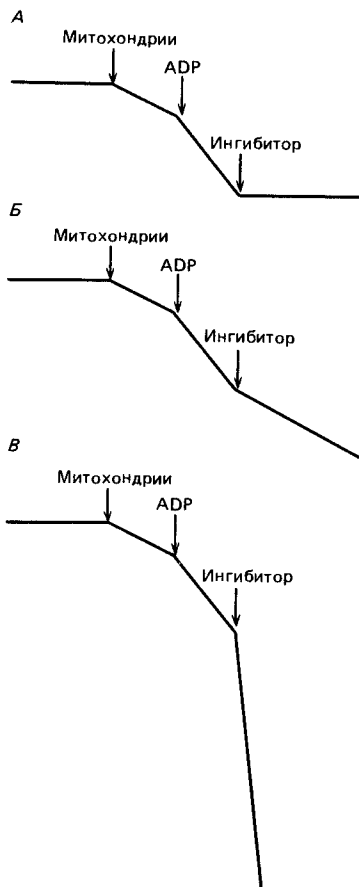


Рис. 7-10. Графики поглощения кислорода митохондриями в присутствии ингибиторов разных типов (задача 7-15).

щения кислорода вновь резко падала до первоначального (фонового) уровня.

- Почему при добавлении ADP скорость поглощения кислорода значительно возрастала по сравнению с фоновым уровнем; почему она вновь снижалась, когда весь ADP превращался в ATP?
- Как вы считаете, почему в отсутствие экзогенно добавленного ADP потребление кислорода митохондриями происходило с низкой фоновой скоростью?
- Сколько молекул ATP синтезировалось при переносе двух электронов на кислород по электротранспортной цепи (т. е. каково отношение $P/2e^-$)? Сколько молекул ATP синтезировалось в расчете на один поглощенный атом кислорода (отношение P/O)? (Уравнение реакции окисления имеет следующий вид: $O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O$)
- Какие процессы, зависящие от электрохимического протонного градиента, кроме образования ATP, имеют место в подобных экспериментах?

7-15 Ингибиторы функций митохондрий служат важным инструментом анализа, позволяющим понять механизм их работы. На рис. 7-10 представлены три полярографических записи поглощения кислорода митохондриями в присутствии различных ингибиторов. В всех этих опытах митохондрии вносили в фосфатный буфер, содержащий сукцинат в качестве единственного источника электронов для дыхательной цепи. Через небольшой интервал времени в среду добавляли ADP и затем ингибитор (рис. 7-10). О скорости поглощения кислорода в разные моменты времени судили по углу наклона прямолинейных отрезков кривой — чем больше наклон, тем выше скорость.

- Пользуясь приведенным ниже перечнем ингибиторов, определите, какие из них могли быть использованы в каждом из трех опытов, представленных на рис. 7-10. Все ингибиторы останавливали синтез ATP.

Ингибитор

- FCCP
- Малонат
- Цианид
- Атрактилал
- Олигомицин
- Бутилмалонат

Функция

- Делает мембраны проницаемыми для протонов
Препятствует окислению сукцината
Ингибирует цитохромоксидазу
Ингибирует ADP/ATP-транслоказу, действующую по механизму антипорта
Ингибирует ATP-синтазу
Блокирует поглощение сукцината митохондриями

- Используя данные экспериментов, представленные на рис. 7-10, попытайтесь изобразить кривые поглощения кислорода митохондриями при последовательном добавлении перечисленных ниже пар ингибиторов:

- FCCP, затем цианид;
- FCCP, затем олигомицин;
- Олигомицин, затем FCCP.

7-16 У метанобразующих бактерий конечным продуктом электронного транспорта является метан. Например, бактерия *Methanosarcina barkeri*, растущая в атмосфере водорода и использующая в качестве субстрата метанол, осуществляет перенос электронов от водо-

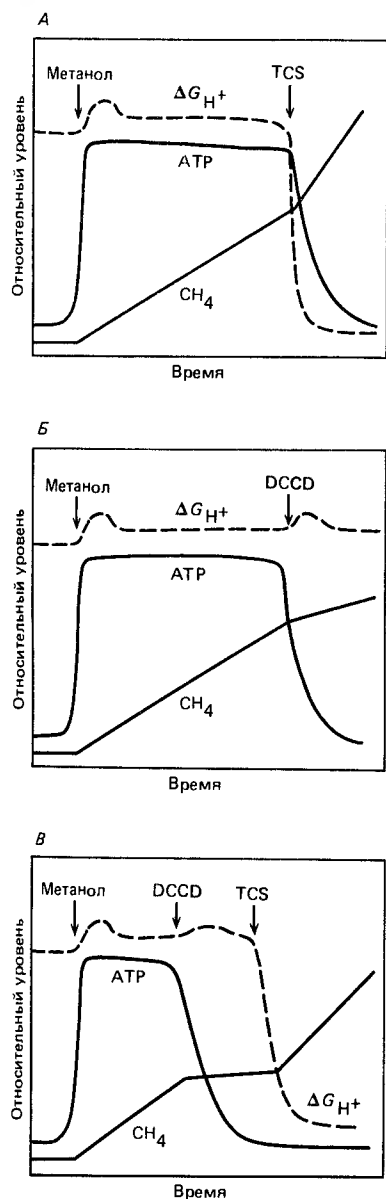


Рис. 7-11. Динамика выделения метана (CH₄) после добавления метанола в культуру метанобразующих бактерий, растущих в атмосфере водорода (H₂) (задача 7-16). Величины электрохимического протонного градиента (ΔG_H⁺), внутриклеточной концентрации ATP и образование CH₄ выражены в произвольных единицах.

рода к метанолу, в результате чего образуются метан и вода:

$$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}.$$

Эта реакция аналогична реакции переноса электронов от углеводородсодержащих соединений к кислороду с образованием воды и диоксида углерода, осуществляемой аэробными бактериями и митохондриями. Вначале, однако, было не совсем ясно, как синтезируется ATP при метаногенезе у метанобразующих бактерий: за счет фосфорилирования, сопряженного с транспортом электронов, или в реакциях субстратного фосфорилирования.

В опытах, проиллюстрированных на рис. 7-11, к культуре метанобразующих бактерий, выращенных в атмосфере водорода, добавляли метанол и следили за изменением выделения в среду метана (CH₄), величиной электрохимического протонного градиента (ΔG_H⁺) и внутриклеточной концентрацией ATP. При этом определяли также действие двух ингибиторов: TCS, разрушающего электрохимический протонный градиент, и DCCD, непосредственно ингибирующего ATP-синтазу. Во всех экспериментах добавление метанола приводило к возрастанию электрохимического протонного градиента и к увеличению внутриклеточной концентрации ATP. При добавлении TCS (рис. 7-11, А) электрохимический протонный градиент исчезал и синтез ATP прекращался; однако выделение CH₄ при этом продолжалось. При добавлении DCCD (рис. 7-11, Б) прекращался синтез ATP и подавлялось выделение CH₄, однако не происходило какого-либо изменения электрохимического протонного градиента. Добавление TCS после того, как синтез ATP и образование CH₄ были подавлены ингибитором DCCD (рис. 7-11, В), приводило к исчезновению электрохимического протонного градиента, но стимулировало образование CH₄.

- Известно, что 2,4-динитрофенол разрушает электрохимический протонный градиент в митохондриях. Можно ли ожидать, что его влияние на митохондрии будет аналогичным действию TCS на метанобразующие бактерии, т.е. ингибируя образование ATP, он не будет подавлять образование CO₂? Почему?
- Известно, что олигомицин ингибирует ATP-синтазу в митохондриях. Можно ли ожидать, что он будет действовать на митохондрии аналогично действию DCCD на метанобразующие бактерии, а именно блокировать образование CO₂, не изменяя электрохимический протонный градиент? Почему?
- Если к митохондриям, функции которых подавлены олигомицином, добавить 2,4-динитрофенол, произойдет ли стимуляция образования CO₂, подобно тому как при добавлении TCS к метанобразующим бактериям, метаболизм которых подавлен DCCD, стимулируется образование CH₄? Объясните ваш ответ.
- По какому механизму синтезируется ATP у метанобразующих бактерий: путем фосфорилирования, сопряженного с транспортом электронов, или путем субстратного фосфорилирования?

7-17 Электрохимический протонный градиент ответствен не только за образование ATP в клетках бактерий, в митохондриях и хлоропластах, но также за обеспечение энергией бактериальных жгутиков. Считается, что жгутиковый «мотор» приводится в движение непосредственно потоком протонов, проходящих через него. Чтобы проверить это предположение, вы изучаете штамм *Streptococcus*, клетки которого обладают подвижностью. Подвижность зависит от присутствия в среде субстрата окисления - глюкозы,

в отсутствие глюкозы (или иного субстрата, пригодного для окисления) движения не наблюдается. Используя ряд ионофоров, изменяющих градиент pH или мембранный потенциал (два компонента электрохимического протонного градиента), вы сделали несколько наблюдений.

1. Движение бактерий, происходящее в присутствии глюкозы, прекращается при добавлении протонного ионофора, FCCP.
 2. Калиевый ионофор валиномицин не влияет на подвижность бактерий в среде, содержащей глюкозу и K^+ .
 3. Если в среде не содержится глюкозы, но есть ионы K^+ , подвижность не появляется при добавлении валиномицина.
 4. Если в среде нет глюкозы, но содержатся ионы Na^+ , то подвижность появляется после добавления валиномицина, но по прошествии небольшого промежутка времени исчезает.
- Все эти наблюдения суммированы в табл. 7-3.

Таблица 7-3. Действие ионофоров на подвижность бактерий дикого типа (задача 7-17)

Наблюдение	Глюкоза	Ионофор	Ион в среде	Действие на бактерии
1	Присутствует	FCCP (H^+)	—	Остановка движения
2	Присутствует	Валиномицин (K^+)	K^+	Продолжение движения
3	Отсутствует	Валиномицин (K^+)	K^+	Остаются неподвижными
4	Отсутствует	Валиномицин (K^+)	Na^+	Двигаются, но недолго

Примечание: специфичность ионофора указана в скобках.

- А. Объясните, каким образом каждое из этих наблюдений согласуется с гипотезой о том, что жгутик бактерий приводится в движение потоком протонов (концентрация K^+ внутри этих бактерий была ниже, чем во внешней среде).
- Б. Бактерии дикого типа подвижны как в присутствии, так и в отсутствие кислорода. Однако бактерии-мутанты, дефектные по АТР-синтетазе, в норме сопрягающей поток протонов с образованием АТР, подвижны только в присутствии кислорода. Чем обусловлена подвижность нормальных бактерий в отсутствие кислорода в среде, когда нет потока электронов? Как вы считаете, почему дефект по АТР-синтетазе препятствует подвижности бактерий-мутантов?

Хлоропласты и фотосинтез (МБК 7.3)

7-18 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Внутренняя мембрана хлоропласта окружает большую центральную область, называемую _____, которая представляет собой аналог митохондриального матрикса.
- Б. Фотосинтетическая система поглощения света, цепь транспорта электронов и АТР-синтаза находятся в уплощенных дисковидных мешочках, называемых _____.
- В. Многочисленные реакции, протекающие при фотосинтезе, могут

- быть разделены на две большие категории: реакции _____ и реакции _____.
- Г. Фиксация углерода катализируется ферментом _____, который считается самым распространенным белком на Земле.
- Д. Превращение CO_2 в углеводы происходит в цикле реакций, который называется циклом _____.
- Е. Дисахарид _____ — это то основное соединение, в виде которого углеводы транспортируются из одних клеток растения в другие; она выполняет здесь ту же функцию, что и глюкоза в клетках животных.
- Ж. _____ — это крупный полимер глюкозы, который, подобно гликогену в животных клетках, служит у растений запасным углеводом.
- З. Растения, которые накапливают CO_2 , называются _____-растениями; все другие называются _____-растениями.
- И. Энергия, необходимая для осуществления электронного транспорта при фотосинтезе, извлекается из солнечного света, поглощаемого молекулами _____.
- К. Фотосистема состоит из двух тесно связанных компонентов: _____, который нужен для улавливания энергии света, и _____, который переносит возбужденные электроны на акцепторы в составе электротранспортной цепи.
- Л. При фотосинтезе у растений и цианобактерий как АТФ, так и NADPH образуются в двухступенчатом процессе, называемом _____.
- М. Два этапа энергизации электронов, катализируемые фотосистемами I и II, вместе образуют _____ фотосинтеза.
- Н. При _____ фотосистема I в хлоропластах переключается на циклическую форму работы, при которой энергия направляется на синтез АТФ вместо NADPH.
- 7-19** Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.
- А. В общем можно было бы представить себе хлоропласт как сильно увеличенную в размере митохондрию, в которой кристы собраны в стопки связанных между собой субмитохондриальных частиц, погруженных в матрикс.
- Б. Для превращения CO_2 в углеводы требуется непосредственно энергия света, тогда как для образования O_2 энергия света необходима опосредованно.
- В. Главная реакция фиксации углерода состоит в том, что CO_2 атмосферы реагирует с пятиуглеродным соединением рибулозо-1,5-бисфосфатом с образованием двух молекул трехуглеродного соединения 3-фосфоглицерата.
- Г. Для образования органических молекул из CO_2 и H_2O требуется как энергия связанного фосфата (АТФ), так и восстановительная сила (NADPH).
- Д. Чтобы избежать потерь из-за фотодыхания, многие растения, живущие в теплом сухом климате, выработали приспособление, заключающееся в «накачивании» CO_2 в клетки обкладки проводящих пучков, чем обеспечивается высокая концентрация CO_2 для рибулозобисфосфат-карбоксилазы.
- Е. Процесс превращения энергии начинается с того, что молекула хлорофилла возбуждается квантом света и один электрон переходит на новую орбиту с более высокой энергией.
- Ж. Когда молекула хлорофилла в антенном комплексе поглощает фотон, возбужденный электрон быстро переносится с одной моле-

- кулы хлорофилла на другую, пока не достигнет фотохимического реакционного центра.
- З. Фотосистема обеспечивает активацию светом непосредственного переноса электрона с одной молекулы, например цитохрома, который является слабым донором электронов, на другую молекулу, например хинона, который в восстановленной форме является сильным донором электронов.
 - И. Пурпурные бактерии используют свой фотохимический реакционный центр для генерации электрохимического протонного градиента на плазматической мембране, который в свою очередь служит движущей силой образования АТФ и обратного транспорта электронов, необходимого для образования NADH.
 - К. За счет объединения двух фотосистем в Z-схеме фотосинтеза энергизации двух электронов из воды двумя фотонами света достаточно для восстановления NADP^+ до NADPH.
 - Л. Баланс между нециклическим фотофосфорилированием, при котором образуются АТФ и NADPH, и циклическим фотофосфорилированием, приводящим к образованию только NADPH, регулируется в соответствии с потребностью в АТФ.
 - М. Интактные тилакоидные диски сходны с субмитохондриальными частицами в том, что участки электротранспортной цепи, сопряженные с использованием NADP^+ , ADP и фосфата, расположены с наружной стороны мембраны.
 - Н. Поступление глицеральдегид-3-фосфата из хлоропластов это не только основной источник фиксированного углерода для остальной части клетки, но также источник восстановительной силы и АТФ, необходимых для других биосинтетических реакций в цитозоле.

7-20 Вспомнив знаменитый опыт Джозефа Пристли, в котором веточка мяты сохранила жизнь мыши в герметичной камере, вы можете проделать аналогичный эксперимент, чтобы узнать, как ведут себя C_3 - и C_4 -растения, когда оказываются вместе в замкнутом пространстве. Вы можете поместить растение кукурузы (C_4) и герани (C_3) в герметичную пластиковую камеру с нормальным составом воздуха (концентрация CO_2 – 300 частей на миллион) и поставить ее на подоконник в вашей лаборатории. Что произойдет с этими растениями? Будут ли растения конкурировать или сосуществовать? Если они будут конкурировать, какое из них победит и почему?

7-21 Сколько энергии несет видимый солнечный свет? Сколько энергии солнечного света доходит до поверхности Земли? Какова эффективность растений в превращении энергии света в химическую энергию? Ответы на эти вопросы вносят определенную ясность в проблему фотосинтеза.

Каждый квант или фотон света имеет энергию $h\nu$, где h – постоянная Планка ($1,58 \times 10^{-37}$ ккал·с/фотон), а ν – частота света (с^{-1}). Частота равна c/λ , где c – скорость света ($3,0 \times 10^{17}$ нм/с), λ – длина волны в нм. Таким образом, энергия ($\mathcal{E}$) фотона равна $\mathcal{E} = h\nu = hc/\lambda$.

- А. Рассчитайте энергию одного моля фотонов (6×10^{23} фотон/моль) волн 400 нм (фиолетовый свет), 680 нм (красный свет) и 800 нм (ближний инфракрасный свет).
- Б. Яркий солнечный свет приносит на землю 0,3 ккал/с на квадратный метр. Предполагая для простоты, что солнечный свет это

монохроматический свет с длиной волны 680 нм, рассчитайте, за какое время один моль фотонов покроет поверхность площадью в один квадратный метр.

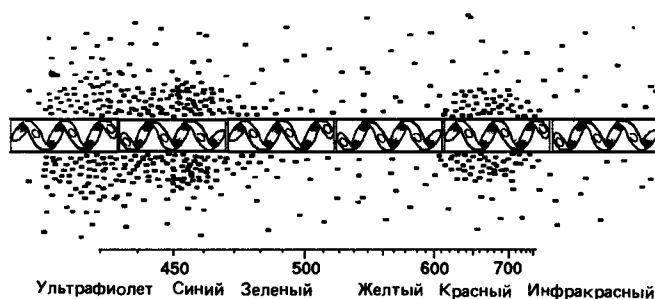
- В. Предполагая, что для фиксации одной молекулы CO_2 в процессе синтеза углевода при оптимальных условиях требуется восемь фотонов (8–10 фотонов – принятая в настоящее время величина), рассчитайте, сколько времени понадобится растению томата (листовая поверхность которого один квадратный метр), чтобы синтезировать один моль глюкозы из CO_2 . Можете принять, что фотоны бомбардируют лист со скоростью, вычисленной в пункте Б, и все падающие на лист фотоны поглощаются листом и используются для фиксации CO_2 .
- Г. Если при фиксации одного моля CO_2 с образованием углевода потребляется 112 ккал/моль, какова эффективность превращения световой энергии в химическую после захвата фотона? Предположите опять, что для фиксации одной молекулы CO_2 требуется восемь фотонов красного света (680 нм).

7-22 Предположим, что ваш руководитель решил расширить круг объектов для изучения фотосинтеза от водорослей до высших растений и поручил вам изучить фотосинтетическую фиксацию углерода у кактусов. Сначала опыты не дают положительных результатов: у вас получается, что растения кактуса не фиксируют CO_2 даже при прямом солнечном освещении. Ваши коллеги, изучая одуванчики, получают в тех же условиях прекрасное включение $^{14}\text{CO}_2$ в течение нескольких секунд с момента добавления углекислоты и легко картируют новые биохимические пути. Находясь в подавленном состоянии, вы однажды уходите из лаборатории, не разобрав камеры для работы с радиоактивными веществами. На следующее утро, собираясь закончить работу с кактусом, вы к своему великому удивлению обнаруживаете, что он включил большое количество $^{14}\text{CO}_2$. Очевидно, что кактус фиксировал углерод ночью. Повторив эти опыты ночью в полной темноте, вы устанавливаете, что растения кактуса великолепно включают метку. Сильно изменив распорядок дня (на что ваша жена смотрит с подозрением), вы наконец добиваетесь некоторого прогресса в работе. Оказывается, что после кратковременной экспозиции с $^{14}\text{CO}_2$ в растении метится в основном только одно соединение – малат. За ночь это меченое соединение накапливается, причем до очень высокого уровня, в специализированных вакуолях внутри клеток, содержащих хлоропласты. Кроме того, в этих же клетках исчезает крахмал. Однако днем на свету исчезает малат и накапливается меченый крахмал. Далее вы обнаруживаете, что $^{14}\text{CO}_2$ вновь появляется в этих клетках на свету.

Эти результаты по некоторым признакам напоминают потребление CO_2 C_4 -растениями, но по другим признакам сходства нет.

- А. Почему для образования в клетках кактуса крахмала нужен свет? Так ли обстоит дело и с C_4 -растениями?
- Б. Исходя из реакций потребления CO_2 C_4 -растениями, представьте в виде краткой схемы путь фиксации в кактусе. Какие реакции протекают в нем днем, а какие – ночью?
- В. Кактус, потеряв весь крахмал, не мог бы фиксировать CO_2 , тогда как C_4 -растения фиксируют углекислоту и в таком случае. Почему для фиксации CO_2 кактусу требуется крахмал, а C_4 -растениям – нет?
- Г. Можете ли вы объяснить, почему указанный выше метод фиксации CO_2 выгоден для растений кактуса?

Рис. 7-12. Опыт по выявлению спектра действия для нитчатых зеленых водорослей (задача 7-23). Бактерии, обозначенные маленькими прямоугольниками, в начале опыта были равномерно распределены по пробирке.



7-23 Детальное изучение спектров поглощения и спектров действия у растений привело в конечном итоге к представлению о двух взаимосвязанных фотосистемах, действующих в хлоропластах. Спектр поглощения свидетельствует о количестве световой энергии, поглощенной фотосинтетическими пигментами при разных длинах волн. Спектр действия – это скорость фотосинтеза (выраженная, например, в количестве выделяемого O_2 или фиксируемого CO_2), зависящая от улавливания фотонов.

Первое измерение спектра действия было сделано, по-видимому, в 1882 г. Т. Энгельманом, использовавшим простое оборудование и остроумный план эксперимента. Он помещал нитчатые зеленые водоросли в пробирку с суспензией потребляющих кислород бактерий и сначала давал бактериям возможность поглотить весь кислород из среды, а затем освещал пробирку светом, который был пропущен через призму для получения спектра. Через короткое время Энгельман наблюдал картину, изображенную на рис. 7-12. Охарактеризуйте спектр действия этой водоросли и объясните, что произошло в опыте.

7-24 Если бы все пигменты улавливали световую энергию и передавали ее в фотосистему с одинаковой эффективностью, то спектр поглощения и спектр действия должны были бы иметь одинаковую форму; однако два спектра несколько различаются (рис. 7-13, А). Если берут отношение двух спектров (рис. 7-13, Б), то выявляется сильно выраженное различие при больших длинах волн – так называемое «красное падение». В 1957 г. Эмерсон обнаружил, что если облучать растение светом, состоящим из более коротких (650 нм) и более длинных, но менее эффективных для фотосинтеза (700 нм), длин волн, то скорость выделения O_2 становится гораздо более высокой, чем при использовании света только одной из указанных выше длин волн. Этот результат, который наряду с другими фактами указывает на то, что две фотосистемы (называемые

Рис. 7-13. Спектры поглощения и действия (А) и отношение спектра действия к спектру поглощения (Б) для водоросли *Chlorella* (задача 7-24). Спектр действия показывает выделение O_2 при разных длинах волн. Ордината (Б) дана в произвольных единицах.

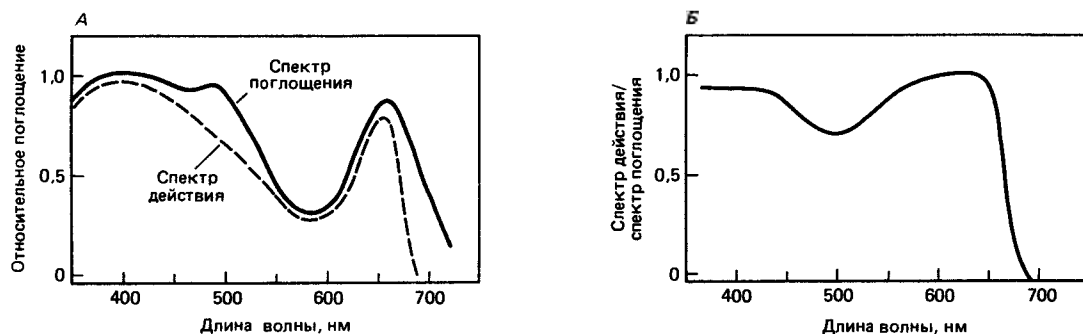
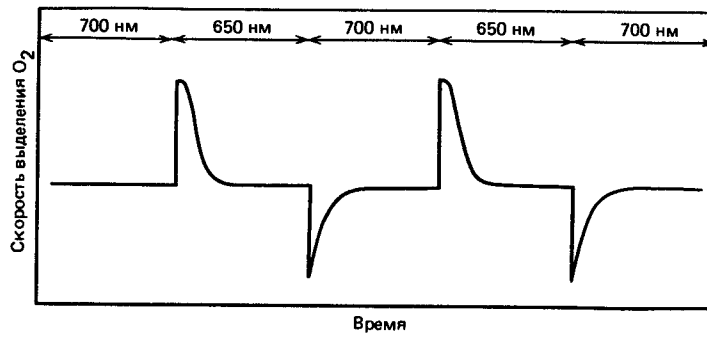


Рис. 7-
цитохр
рослей
в отсут
DCMU
диагра
нижня
мов.

Рис. 7-14. Хроматические переходы, наблюдаемые при быстром переключении света с длины волны 650 нм на длину волны 700 нм (задача 7-24). Интенсивности света при двух длинах волн подобраны так, чтобы во всех случаях скорость выделения O_2 была одинаковой.



теперь фотосистемой I и фотосистемой II) взаимодействуют друг с другом, привел к созданию знакомой Z-схемы фотосинтеза.

Важные данные о том, в каком порядке две фотосистемы связаны друг с другом, были получены в опытах, где освещение проводили попеременно источниками света с длинами волн 650 и 700 нм. Как видно из рис. 7-14, переключение освещения с 700 на 650 нм сопровождалось кратковременной «вспышкой» выделения O_2 , тогда как переключение света с длины волны 650 на 700 нм сопровождалось временным подавлением выделения O_2 .

Используя свои знания о Z-схеме фотосинтеза, попытайтесь объяснить, почему происходят эти так называемые хроматические переходы, и сделайте заключение о том, к какому свету, с длиной волны 650 или 700 нм, более чувствительна фотосистема II, которая принимает электроны от H_2O .

7-25 Наиболее убедительное раннее доказательство Z-схемы фотосинтеза было получено в опытах по измерению состояния окисления цитохромов в водорослях при разных режимах освещения (рис. 7-15). Освещение светом с длиной волны 680 нм вызывало окисление цитохромов (линия на графике поднимается вверх); дополнительное освещение светом с длиной волны 562 нм вызывало восстановление цитохромов (линия на графике идет вниз);

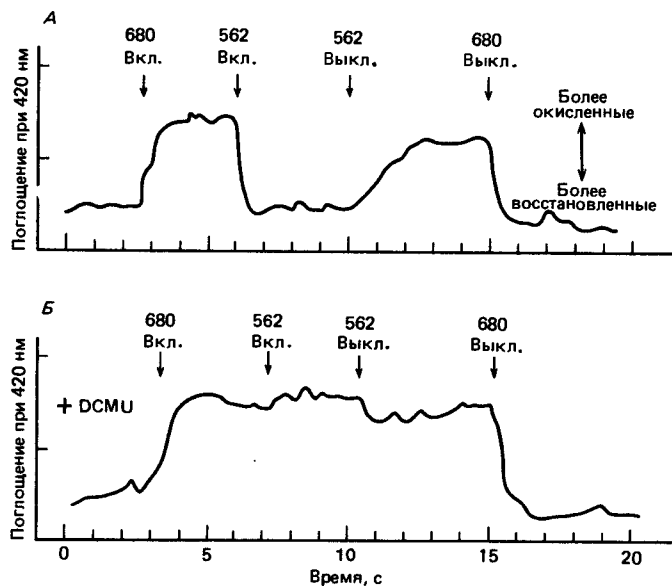


Рис. 7-15. Состояние окисления цитохромов после освещения водорослей светом разных длин волн в отсутствие (А) и в присутствии (Б) DCMU (задача 7-25). Верхняя диаграмма – окисление цитохромов; нижняя – восстановление цитохромов.

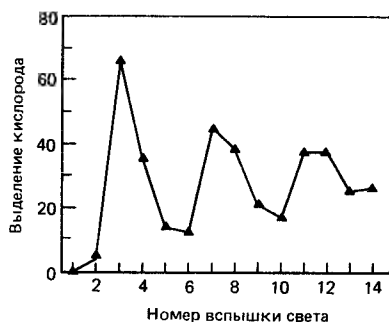
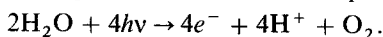


Рис. 7-16. Выделение кислорода хлоропластами шпината в ответ на насыщающие вспышки света (задача 7-26). Хлоропласты предварительно помещали в темноту на 40 мин, чтобы они все пришли в одинаковое «фоновое» состояние.

оба эффекта можно было обратить путем выключения источника света (рис. 7-15, А). В присутствии гербицида DCMU, блокирующего транспорт электронов через цитохромы и подавляющего выделение O_2 , восстановление цитохрома светом с длиной волны 562 нм прекращалось, вместо этого происходило небольшое дополнительное окисление (рис. 7-15, Б).

- Свет какой длины волны стимулирует фотосистему I, а какой – фотосистему II у исследованных водорослей?
- Каким образом эти результаты подтверждают Z-схему фотосинтеза, т. е. идею о том, что существуют две фотосистемы, связанные цитохромами?
- В какой части цепочки цитохромов гербицид DCMU блокирует электронный транспорт – ближе к фотосистеме I или к фотосистеме II?

7-26 Фотосистема II принимает электроны от воды, что сопровождается образованием O_2 , и передает их затем по электронтранспортной цепи к фотосистеме I. Каждый фотон, поглощенный фотосистемой II, может вызвать перенос только одного электрона, и еще четыре электрона должны быть отняты от воды, чтобы образовалась одна молекула O_2 . Таким образом, для выделения одной молекулы кислорода необходимо четыре фотона:



Каким образом объединены четыре фотона при образовании O_2 ? Обязательно ли, чтобы четыре фотона достигли одного реакционного центра одновременно? Могут ли четыре активированных реакционных центра действовать кооперативно для выделения одной молекулы O_2 ? Или существует некий тип «зубчатого колеса», отбирающего четыре электрона от воды и переносящего их по одному в реакционный центр? Чтобы изучить эту проблему, вы освещаете выдержанные в темноте хлоропласты шпината серией коротких насыщающих вспышек света (длительностью 2 мкс), разделенных небольшими интервалами темноты (0,3 с), и измеряете выделение O_2 , происходящее в результате этих вспышек. При таком световом режиме большинство фотосистем улавливает фотон при каждой вспышке. Как видно из рис. 7-16, O_2 выделяется с отчетливой периодичностью: первый резкий подъем выделения O_2 приходится на момент третьей вспышки света, а последующие пики – на каждую четвертую вспышку начиная с этого момента.

Если вы сначала подавляете реакционные центры фотосистемы II гербицидом DCMU (на 97%), а затем повторяете вышеописанный опыт, то будет наблюдаться та же периодичность выделения O_2 , но пики будут составлять только 3% от их величин в опыте без ингибирования.

- Каким образом эти результаты помогают выбрать одну из трех возможностей, сформулированных в начале этого раздела (одновременное действие, кооперативность между реакционными центрами, «зубчатое колесо»)?
- Как вы считаете, почему первый подъем выделения O_2 происходит после третьей вспышки света, тогда как последующие максимумы возникают с периодичностью в четыре вспышки? (Какой вывод можно сделать из этого наблюдения относительно состояния хлоропластов, адаптированных к темноте?)
- Можете ли вы объяснить, почему периодичность выделения O_2 становится менее выраженной с увеличением числа вспышек света?

Рис. 7-15
подки
ных в
(НС)
растан
7-27).
ствии
ордин
ной ки
случая
действ
а зате
15 с ш
и ^{32}P
вали и
синтез
АТР.

Рис. 7-16
подки
ных в
(НС)
растан
7-27).
ствии
ордин
ной ки
случая
действ
а зате
15 с ш
и ^{32}P
вали и
синтез
АТР.

Рис. 7-17
подки
ных в
(НС)
растан
7-27).
ствии
ордин
ной ки
случая
действ
а зате
15 с ш
и ^{32}P
вали и
синтез
АТР.

Рис. 7-18
подки
ных в
(НС)
растан
7-27).
ствии
ордин
ной ки
случая
действ
а зате
15 с ш
и ^{32}P
вали и
синтез
АТР.

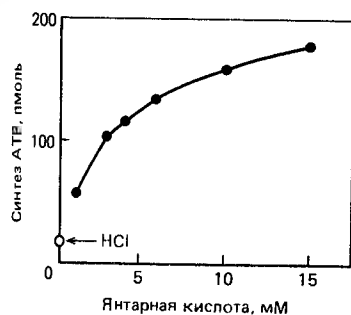


Рис. 7-17. Образование АТФ при подкислении суспензии тилакоидных везикул соляной кислотой (HCl) и янтарной кислотой в возрастающих концентрациях (задача 7-27). Образование АТФ в присутствии HCl показано точкой на оси ординат, где концентрация янтарной кислоты равна нулю. Во всех случаях суспензию подвергали воздействию кислоты в течение 60 с, а затем обрабатывали в течение 15 с щелочью в присутствии ADP и $^{32}\text{PO}_4$; затем реакцию останавливали и измеряли количество ново-синтезированной радиоактивной АТФ.

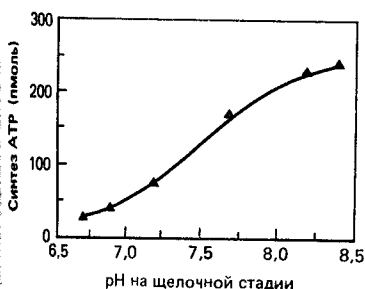


Рис. 7-18. Образование АТФ при разных pH на щелочной стадии опыта (задача 7-27).

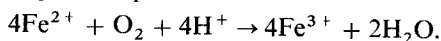
7-27 Хлоропласты синтезируют АТФ в принципе так же, как митохондрии: транспорт электронов сопряжен в них с перекачиванием протонов, а энергия аккумулируется в возникающем электрохимическом протонном градиенте, используемом для образования АТФ с помощью АТФ-синтетазы. В одном из ранних и наиболее убедительных тестов на хемиосмотическое сопряжение электронного транспорта и синтеза АТФ использовались тилакоидные везикулы, выделенные из хлоропластов шпината.

В этих опытах образование АТФ определяли в суспензии тилакоидных везикул (поверхность тилакоида, обращенная к строме, была наружной поверхностью пузырьков-везикул). Суспензию сначала подкисляли до pH 4,0, а затем подщелачивали в присутствии ADP и $^{32}\text{PO}_4$.

Из рис. 7-17 видно, что выход АТФ был более высоким в том случае, когда для подкисления использовали янтарную кислоту, чем в том случае, когда пользовались HCl. Далее, выход АТФ возрастал с увеличением концентрации янтарной кислоты (хотя во всех опытах pH растворов был 4,0). Как видно из рис. 7-18, выход АТФ зависел от pH и на щелочной стадии эксперимента: он увеличивался, пока значение pH не достигало 8,5.

- Почему при подкислении суспензии янтарной кислотой выход АТФ больше, чем при подкислении соляной кислотой? Почему выход АТФ растет с увеличением концентрации янтарной кислоты? (Янтарная кислота содержит две карбоксильные кислые группы с pK 4,2 и 5,5).
- Почему выход АТФ так сильно зависит от pH на щелочной стадии эксперимента?
- Попытайтесь предсказать эффект от следующих воздействий во время щелочной стадии эксперимента и обоснуйте свое предсказание.
 - Добавление FCCP, являющегося разобщителем электронного транспорта и синтеза АТФ.
 - Добавление DCMU, блокирующего электронный транспорт через цитохромы.
 - Освещение ярким светом.
 - Инкубация в полной темноте.

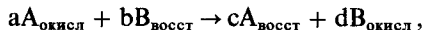
7-28 *Thiobacillus ferrooxidans* — это бактерия, которая живет в рудных отвалах при pH 2. В горнодобывающей промышленности она используется для выделения меди и урана из низкосортной руды путем кислого выщелачивания. Бактерии окисляют Fe^{2+} до Fe^{3+} , который в свою очередь окисляет (и делает растворимыми) эти минорные компоненты руды. Удивительно, что бактерии живут в столь агрессивной среде. Они существуют за счет того, что градиент pH между внешней средой и цитоплазмой (pH 6,5) приводит в действие механизм синтеза АТФ и NADPH, которые могут использоваться для фиксации CO_2 и азота. Для поддержания постоянного внутриклеточного pH *T. ferrooxidans* использует электроны от Fe^{2+} для восстановления O_2 до воды, удаляя таким образом протоны:



Какова энергетика указанных процессов? Является ли поток электронов от Fe^{2+} к O_2 энергетически выгодным? Достаточен ли электрохимический протонный градиент на мембране для осуществления синтеза АТФ? Насколько трудно восстановить NADP^+ электронами от Fe^{2+} ? Являются ли эти вопросы ключевыми для

понимания того, как *T. ferrooxidans* удастся процветать в столь неблагоприятных условиях? Для ответа нужно обратиться к основам энергетики реакций восстановления.

В таких реакциях, описываемых уравнением



способность отдавать электроны характеризуется величиной ΔE , представляющей собой разность между E_0 (стандартный потенциал части веществ клетки, или парциальный потенциал) для донора электронов (соединения, которые окисляются) и E_0 для акцептора электронов (соединения, которые восстанавливаются):

$$\Delta E_0 = E_0^A - E_0^B.$$

Когда окислительно-восстановительная реакция идет в нестандартных условиях (стандартными условиями считаются: температура 25°C или 298 K и все концентрации – 1 M), способность отдавать электроны может быть описана следующим уравнением

$$\Delta E = \Delta E_0 - 2,3 \frac{RT}{nF} \log_{10} \frac{[A_{\text{восст}}]^c [B_{\text{окисл}}]^d}{[A_{\text{окисл}}]^a [B_{\text{восст}}]^b},$$

где $R = 1,98 \cdot 10^{-3}$ ккал · К⁻¹/моль⁻¹,
 T – температура, К,

n – число перенесенных электронов,

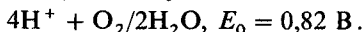
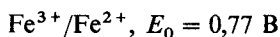
$F = 23$ ккал · В⁻¹ · моль⁻¹.

ΔG связано с ΔE соотношением

$$\Delta G = -nF\Delta E.$$

Заметьте, что знаки при ΔG и ΔE противоположны; таким образом, протеканию окислительно-восстановительной реакции благоприятствуют условия, когда ΔE – положительная величина, а ΔG – отрицательная.

- А. Какова величина ΔE для восстановления O_2 железом Fe^{2+} , если допустить, что реакция проходит в стандартных условиях? Парциальные потенциалы равны



Какова величина ΔG для этой реакции?

- Б. Напишите суммарное уравнение реакции восстановления $NADP^+ + H^+$ с помощью Fe^{2+} . Какова величина ΔE этой реакции при стандартных условиях?



Какова величина ΔG , если концентрации Fe^{3+} и Fe^{2+} одинаковы, концентрация $NADPH$ в десять раз выше концентрации NAD^+ (без учета протонов), а температура равна 310 K? Какова величина ΔG при этих двух условиях?

- В. Изменение свободной энергии (ΔG), которым сопровождается перенос протонов из внешней среды (рН 2) внутрь клетки *T. ferrooxidans* (рН 6,5), рассчитывается по уравнению Нернста:

$$\Delta G = 2,3RT \log_{10} \frac{[H^+]_{\text{внутри}}}{[H^+]_{\text{внешне}}} + nFV,$$

где V – мембранный потенциал. У клеток *T. ferrooxidans*, выращенных при рН 2, мембранный потенциал равен 0. Полагая, что

$T = 310\text{ K}$ и $\Delta G = 11\text{ ккал/моль}$ для синтеза АТФ в тех условиях, которые обычно существуют внутри клеток этого микроорганизма, ответьте, сколько протонов (округленно, до целого числа) должно войти в клетку через мембрану, где расположена АТФ-синтетаза, чтобы начался синтез АТФ? Чтобы транспорт протонов был сопряжен с синтезом АТФ, как протоны должны проходить через синтетазу: по одному или все сразу?

- Г. Сколько протонов (округленно, до целого числа) должно войти в клетку, чтобы произошло восстановление NADP^+ железом (Fe^{2+}) при стандартных условиях? Объясните, как транспорт протонов сопряжен с восстановлением NADP^+ .
- Д. Сколько молей Fe^{2+} должно окисляться у *T. ferrooxidans* до Fe^{3+} , чтобы 1 моль CO_2 включился в углеводы через цикл Кальвина?

Эволюция электротранспортных цепей (МБК 7.4)

7-29 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. При _____ АТФ образуется путем субстратного фосфорилирования; при этом используется энергия, высвобождаемая в реакциях частичного окисления органических молекул, богатых водородом.

7-30 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Разные организмы выделяют разные конечные продукты брожения, но чаще всего это органические кислоты; тем самым осуществляется выделение протонов.
- Б. Локальное снижение pH среды даст преимущество для выживания бактериям, обладающим трансмембранными протонными насосами; последние откачивают H^+ из клеток и тем самым предотвращают гибель бактерий от внутриклеточного закисления.
- В. Крупным «прорывом» в эволюции энергетических механизмов было появление фотохимических реакционных центров, способных производить такие молекулы, как NADH , используя имеющиеся во внешней среде соединения, например H_2S .
- Г. Эволюция организмов, способных использовать воду для восстановления CO_2 , шла по пути объединения фотосистемы I, происходящей от зеленых бактерий, и фотосистемы II — от пурпурных бактерий.
- Д. Хотя цианобактерии возникли около 3×10^9 лет назад, количество кислорода в атмосфере практически не увеличивалось вплоть до периода 2×10^9 лет назад из-за осаждения больших количеств окислов железа.
- Е. Считается, что митохондрии произошли путем эндоцитоза бактерий, потерявших способность выживать за счет одной энергии света и полностью переключившихся на дыхание.

Геномы митохондрий и хлоропластов (МБК 7.5)

7-31 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Считается, что мутации, не наследуемые согласно правилам Менделя, которым подчиняется ядерная наследственность, проявляют _____ и локализованы, по-видимому, в генах органелл.
- Б. У почкующихся дрожжей при митозе в почку попадает ограниченное число митохондрий, поэтому клетка, содержащая наряду с митохондриями дикого типа и мутантные митохондрии, может

дать начало дочерним клеткам с каким-то одним видом митохондрий. Этот процесс известен как _____.

- В. У высших животных митохондрии попадают в зиготу главным образом с цитоплазмой яйца, поэтому такие митохондрии проявляют так называемую _____ наследственность.
- Г. Мутанты дрожжей с крупными делециями в митохондриальном ДНК образуют необычно мелкие колонии, когда растут при низкой концентрации глюкозы в среде; все мутанты с таким дефектными митохондриями называются _____.
- Д. _____ – это центральный метаболический путь для удаления азотсодержащих продуктов деградации у высших животных.
- Е. Согласно _____ эукариотические клетки в начале своего эволюционного пути были анаэробными организмами, не содержащими митохондрий или хлоропластов, а затем установился и стабильный симбиоз с бактериями.
- 7-32** Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие нет. Если утверждение неверно, объясните почему.
- А. Каждая из органелл, в которых происходит превращение энергии, реплицирует свою ДНК синхронно с ядерной ДНК и делится вместе с клеткой, благодаря чему количество ДНК органелл поддерживается на постоянном уровне.
- Б. Хотя еще неизвестно, как ДНК уложена в органеллах, ее упаковка по-видимому, ближе к упаковке бактериальных геномов, а не хроматина эукариот, поскольку в органеллах отсутствуют гистоновые белки.
- В. По механизму синтеза белка хлоропласты очень сходны с бактериями, но сильно отличаются от митохондрий, у которых механизм синтеза белка сходен с цитоплазматическим.
- Г. У высших растений многие рибосомные белки хлоропластов закодированы в ядре клетки, но эти ядерные гены имеют явно бактериальное происхождение.
- Д. Генетический код в митохондриях несколько отличается от ядерного генетического кода, но он одинаков в митохондриях у всех изученных до сих пор видов.
- Е. Простота генетической системы митохондрий и относительно низкая точность ее функционирования могут быть причинами повышенной частоты замещения нуклеотидов, наблюдаемой в митохондриальных геномах.
- Ж. Митохондриальные геномы у растений сильно варьируют в содержании ДНК, и все же они, по-видимому, кодируют всего лишь на несколько белков больше, чем гораздо более мелкие митохондриальные геномы животных клеток.
- З. Наличие интронов в генах органелл не должно удивлять, поскольку похожие интроны были обнаружены в сходных генах бактерий от чьих предков, как принято считать, произошли митохондрии и хлоропласты.
- И. Мутации, наследуемые по законам Менделя, затрагивают ядерные гены; мутации, которые не наследуются согласно этим законам, локализованы, по-видимому, в генах органелл.
- К. Зеленые и белые пятна на пестрых листьях обусловлены митохондриальной сегрегацией нормальных и дефектных митохондрий.
- Л. Митохондрии, которые образуются путем простого деления, могут реплицироваться в пролиферирующих эукариотических клетках неопределенное число раз.
- М. Функции митохондрий и хлоропластов, а также экспрессия их генов в значительной мере контролируются ядром клетки.

Рис. 7-1 Временная шкала эволюции митохондриального ДНК – сине-зеленая линия; дупликация и дивергенция серой

- Н. В различных тканях одного организма митохондрии содержат одинаковый набор белков, закодированных в ядерном и митохондриальном геномах.
- О. Перенос белков через мембраны митохондрий и хлоропластов происходит, по-видимому, через специальные адгезионные участки в местах контакта наружной и внутренней мембран этих органелл.
- П. Хлоропласты сами синтезируют большую часть своих липидов, тогда как митохондрии получают их из цитоплазмы.
- Р. Митохондрии как животных, так и растений произошли, вероятно, от особого вида пурпурных фотосинтезирующих бактерий, которые утратили способность к фотосинтезу и сохранили только дыхательную цепь.

7-33 В клетке мышцы содержится примерно 1000 молекул митохондриальной ДНК. Репликация отдельного митохондриального генома длится всего около часа, что составляет 5% от времени генерации клетки (20 ч). Поскольку число митохондриальных геномов на клетку в среднем постоянно, то они должны реплицироваться один раз за клеточный цикл. Как координируется репликация митохондриальных геномов? Реплицируется ли митохондриальная ДНК в любое время на протяжении клеточного цикла или, подобно репликации ядерной ДНК, на какой-то особой стадии цикла, например в S-фазе?

Вы предлагаете элегантный способ ответа на этот вопрос. В общих чертах подход состоит в том, что ^3H -тимидин за время непродолжительной инкубации (2 ч) включается в митохондриальную ДНК клеток мышцы, затем клетки переносят в среду с нерадиоактивным тимидином (для «изгнания» метки) на разные периоды времени, после чего проводят мечение 5-бром урацил-дезоксифосфидом (БУДР) в течение двух часов (рис. 7-19). Любая ДНК, реплицировавшаяся во время обеих инкубаций, будет радиоактивной (благодаря ^3H -тимидину), а ее плотность станет более высокой, чем у нормальной митохондриальной ДНК (благодаря БУДР). Поскольку молекула митохондриальной ДНК имеет форму кольца, ее можно легко отделить от ядерной ДНК и провести анализ этих двух фракций порознь. Используя центрифугирование в градиенте плотности, можно отделить ДНК с высокой плотностью (содержащую БУДР) от ДНК с низкой плотностью (не содержащую БУДР) и измерить количество радиоактивности, связанной с каждой из них. Ваши результаты полного анализа

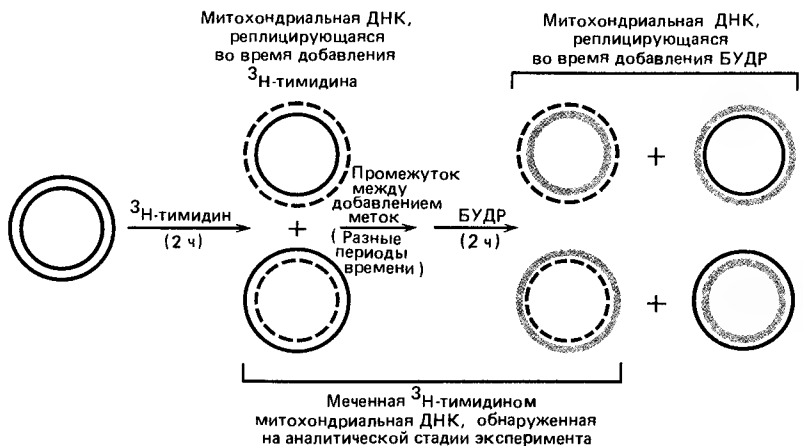


Рис. 7-19. Схема опыта по оценке времени репликации митохондриальной ДНК (задача 7-33). Немеченная митохондриальная ДНК — сплошная линия; ДНК, меченная ^3H -тимидином, — штриховая линия; ДНК, меченная БУДР, — линия серого цвета.

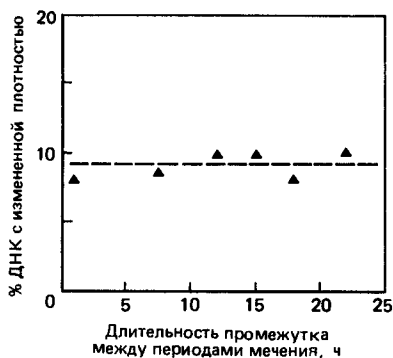


Рис. 7-20. Фракция меченой ^3H -тимидином митохондриальной ДНК с повышенной плотностью при разных по длительности промежутках времени между введением двух меток (задача 7-33). Фракция определена как отношение радиоактивности ДНК с большей плотностью к общей радиоактивности ДНК. Длительность промежутка – период времени от окончания мечения ^3H -тимидином до начала мечения БУДР.

митохондриальной ДНК, приведенные на рис. 7-20, показывают, что доля меченой ^3H -тимидином митохондриальной ДНК с большей плотностью была постоянной независимо от длительности промежутка между введением меток (длительности отмывания нерадиоактивным тимидином).

- Чему больше соответствуют эти результаты: тому, что репликация происходит в какой-то определенный момент клеточного цикла, или тому, что она происходит в произвольное время? Почему?
- Один из ваших коллег критикует план этих опытов. Он считает, что невозможно провести различие между случайной и точно определенной по времени репликацией, потому что клетки росли асинхронно (т.е. внутри клеточной популяции представлены все стадии клеточного цикла). Как это замечание повлияет на вашу интерпретацию?
- Изобразите, пользуясь рис. 7-20, каких результатов можно ожидать при последующем анализе ядерной ДНК. Исходите из того, что фаза синтеза ДНК – S-фаза – занимает в клеточном цикле 5 ч.
- Другой ваш коллега хочет узнать, какими были бы результаты, если бы митохондриальная ДНК реплицировалась в любой момент времени на протяжении клеточного цикла, но после окончания репликации каждая отдельная молекула приступала бы к следующей репликации только в новом клеточном цикле.

7-34 Большая часть молекул мРНК, тРНК и рРНК митохондрий человека транскрибируются только с одной из цепей ДНК. Эти молекулы РНК первоначально входят в один очень длинный транскрипт, составляющий 93% длины нити ДНК. Однако в процессе синтеза митохондриальных белков эти молекулы РНК функционируют как отдельные, независимые виды РНК. Взаимоотношение отдельных РНК с первичным транскриптом и многие особенности генетической системы митохондрий были выяснены путем сравнения последовательностей оснований в РНК с нуклеотидной последовательностью генома. Соответствующая карта генома схематически представлена на рис. 7-21. На рис. 7-22 показаны три сегмента нуклеотидной последовательности митохондриального генома человека и три мРНК, которые транскрибируются с этих участков. Нуклеотиды, кодирующие разные виды тРНК, подчеркнуты; аминокислоты, кодируемые мРНК, указаны одной буквой под центральным основанием каждого кодона.

- Если говорить об используемых кодонах и структуре мРНК, то по каким двум признакам инициация синтеза белка в митохондриях отличается от инициации в цитоплазме?
- По каким двум признакам кодоны терминирования синтеза белка в митохондриях необычны? (Кодоны терминирования отмечены на рис. 7-22 звездочками.)
- Указывает ли расположение последовательностей для тРНК и мРНК в геноме на возможный механизм процессинга первичного транскрипта с образованием отдельных видов РНК?

Рис. 7-21. Карта транскрипции митохондриальной ДНК человека (задача 7-34). Отдельные гены для тРНК обозначены черными кружками; аминокислоты, которые переносятся этими тРНК, указаны этими тРНК, указаны однобуквенным кодом. Три мРНК, чьи подробные последовательности приведены на рис. 7-22, указаны числами.

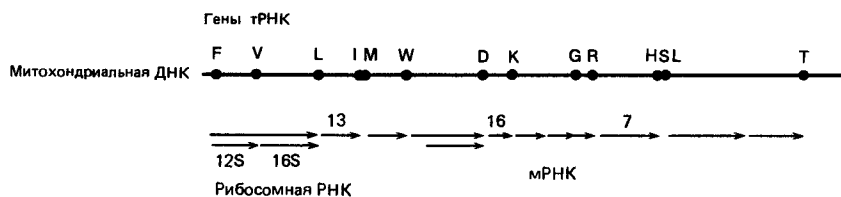


Рис. 7-21. вател... тРНК... митохон... века... после... генам... мРНК... ствук... всех м... гены... после... левой... мРНК... 3'-кон... «хвос... после... после... чем б... кисло... нуклео... указы... терми...

Цикл... М...
.....
.....
.....
.....

Рис. 7-22. три сегмента нуклеотидной последовательности митохондриального генома человека и три мРНК, которые транскрибируются с этих участков. Нуклеотиды, кодирующие разные виды тРНК, подчеркнуты; аминокислоты, кодируемые мРНК, указаны одной буквой под центральным основанием каждого кодона.

Рис. 7-22. Расположение последовательностей нуклеотидов для тРНК и мРНК в трех местах митохондриального генома человека (задача 7-34). Подчеркнутые последовательности относятся к генам тРНК. Последовательности мРНК показаны под соответствующими генами. Средние части всех мРНК и соответствующие им гены опущены (точки). 5'-Концы последовательностей находятся в левой части рисунка. 5'-Концы всех мРНК не модифицированы, а на 3'-концах расположены poly(A)-«хвосты». Кодированные белковые последовательности указаны под последовательностями мРНК, причем буквенное обозначение аминокислоты находится под средним нуклеотидом кодона. Знак «*» указывает местонахождение кодона терминации.

тРНК ^{leu}	тРНК ^{ile}
<u>TTCTTAACA</u> ACATATCCCAT.....CTCAACCTAAGAAATATG ДНК	
ACAUAACCAU.....CUCAAACCUAAAAAAAAA мРНК 13	
М Р	Е Т *
Белок	
тРНК ^{asp}	тРНК ^{lys}
<u>TATATCTTA</u> ATGGCASCATG.....CTCTAGAGCCCACTGTAAA ДНК	
AUGGCACAUG.....CUCUAGAGCCCAAAAAAAAAA мРНК 16	
М А Н	С *
Белок	
тРНК ^{arg}	тРНК ^{his}
<u>ATTACCAAA</u> ATGCCCCTCA.....TTTCTCTTGTAAATATA ДНК	
AUGCCCCUCA.....UUUCCUCUAAAAAAAAA мРНК 7	
М Р L	Ф С С *
Белок	

7-35 У высших растений ДНК хлоропластов весьма постоянна по размеру молекул (120–180 т.п.н.) и по последовательности генов. В противоположность этому митохондриальные ДНК у растений чрезвычайно вариабельны по последовательности генов и размеру (от 218 т.п.н. у турнепса до 2400 т.п.н. у мускусной дыни). Частично эта вариабельность может быть результатом переноса ДНК из хлоропластов в митохондрии.

В одном из экспериментов по изучению переноса генетического материала между геномами органелл был использован определенный фрагмент рестрикции из хлоропластов шпината, который кодировал ген большой субъединицы фермента рибулозобисфосфат-карбоксилазы. В митохондриальном геноме этот ген не обнаружен. ДНК митохондрий и хлоропластов выделяли из цуккини, кукурузы, шпината и гороха. Все препараты ДНК обрабатывали одной и той же рестриктазой и образовавшиеся фрагменты разделяли с помощью электрофореза. Затем фрагменты переносили на фильтр и гибридизовали с радиоактивным фрагментом-зондом, полученным из ДНК хлоропластов шпината. Результаты авторadiографии схематически представлены на рис. 7-23.

- Трудно ли выделить митохондриальную ДНК, не загрязненную хлоропластной ДНК? Как в этих экспериментах контролируется степень загрязнения препаратов митохондриальной ДНК?
- Какие из этих препаратов митохондриальной ДНК могли содержать ДНК хлоропластов?

7-36 Ваша коллега изучала два мутанта гриба *Neurospora*, называя их несколько причудливо *poky* и *runy*. Скорости роста у обоих мутантов почти одинаковые, но гораздо ниже, чем у гриба дикого типа. Найти такое вещество, которое стимулировало бы скорость их роста, не удалось. С помощью биохимического анализа у каждого мутанта были обнаружены отличающиеся от нормы спектры поглощения цитохромов. Для получения генетической характеристики мутантов их скрещивали с диким типом и друг с другом и определяли скорости роста потомков. Вашу коллегу результаты этих опытов привели в недоумение.

Она объяснила, что при спаривании у *Neurospora* гаплоидные ядра родительских клеток сливаются, а затем делятся мейотически с образованием четырех гаплоидных спор, которые легко проверить на скорость роста. Вклады родительских клеток в диплоид



Рис. 7-23. Диаграммы гибридизации зонда из ДНК хлоропластов шпината с митохондриальной ДНК и ДНК хлоропластов из цуккини, кукурузы, шпината и гороха (задача 7-35). Столбики с индексом «М» относятся к митохондриальным ДНК; с индексом «Х» — к ДНК хлоропластов. Рестриктационные фрагменты, с которыми гибридизовалась стандартная ДНК, показаны как темные полосы.

неодинаковы: одна из них (протоперитециальный родитель) дает ядро и цитоплазму, другая (оплодотворяющий родитель) дает практически одно ядро—это очень похоже на то, что происходит в случае яйца и сперматозоида у высших организмов. Как видно из табл. 7-4, от «порядка» скрещиваний зависят свойства потомков: такого явления ваша коллега никогда раньше не наблюдала.

Можете ли вы объяснить эти результаты?

Таблица 7-4. Генетический анализ мутантов *Neurospora* (задача 7-36)

Гибрид	Протоперитециальный родитель	Оплодотворяющий родитель	Количество спор	
			Быстрый рост	Медленный рост
1	<i>roky</i>	× Дикий тип	0	1749
2	Дикий тип	× <i>roky</i>	1334	0
3	<i>ripu</i>	× Дикий тип	850	799
4	Дикий тип	× <i>ripu</i>	793	801
5	<i>roky</i>	× <i>ripu</i>	0	1831
6	<i>ripu</i>	× <i>roky</i>	754	710
7	Дикий тип	× Дикий тип	1515	0
8	<i>roky</i>	× <i>roky</i>	0	1389
9	<i>ripu</i>	× <i>ripu</i>	0	1588

7-37 Мутанты дрожжей с нарушением функционирования митохондрий растут на сбраживаемых субстратах, например на глюкозе, но не способны расти на несбраживаемых субстратах, например на глицероле. Ядерные и митохондриальные мутации можно распознать методом скрещиваний. Почти 200 разных ядерных генов идентифицированы с помощью комплементационного анализа ядерных мутантов *petite* (*pet*). Удивительно, что примерно в четвертой части этих генов мутации затрагивают экспрессию одного митохондриального гена или их ограниченного набора, не блокируя экспрессию остальных.

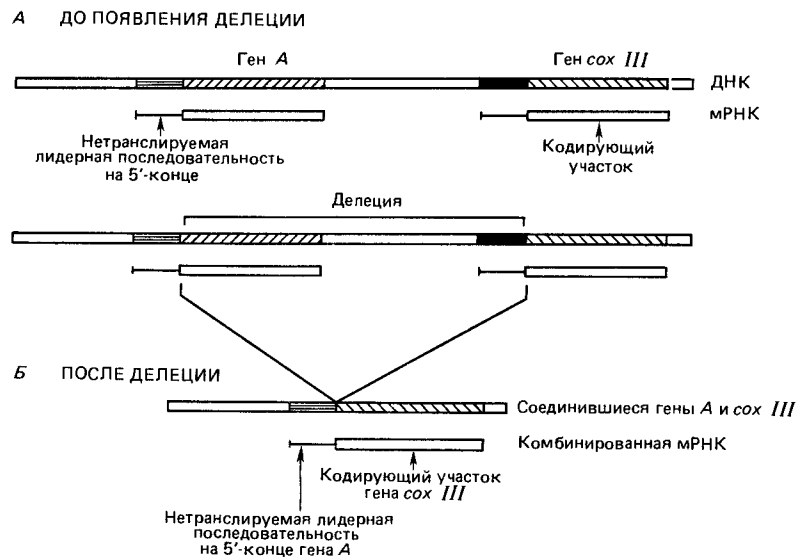
Например, у мутантов *pet494* уровни всех известных продуктов митохондриальных генов не отличаются от нормы, кроме уровня субъединицы III фермента цитохромоксидазы (*coxIII*). Однако уровень и размеры мРНК, кодирующей *coxIII*, остаются обычными. Таким образом, следует предположить, что в экспрессии гена, кодирующего *coxIII*, есть некий посттранскрипционный этап, который регулируется продуктом нормального гена *PET494*. Это соединение может быть необходимо для поддержания трансляции мРНК, кодирующей *coxIII*, или для стабилизации *coxIII* во время сборки комплекса цитохромоксидазы. Чтобы разобраться в этом, были отобраны и проанализированы митохондриальные мутации, приводящие к подавлению дефекта, вызванного мутацией *pet494*. Все эти мутации оказались делециями, при которых участок, кодирующий *coxIII*, соединялся с нетранслируемым 5'-участком другого гена, как схематически изображено на рис. 7-24.

А. Каким образом эти результаты могут помочь при выборе между двумя возможностями: потребностью в указанном продукте для трансляции мРНК, кодирующей *coxIII*, и потребностью в нем для стабилизации белка *coxIII*?

Б. Каждая из митохондриальных делеций приводит к потере одного или более генов, необходимых для реализации функций митохондрий; несмотря на это, указанные выше штаммы дрожжей

Рис. 7. Делеция с делецией после *pet494*

Рис. 7-24. Схематическое представление митохондриальных мутаций с делециями, которые подавляют последствия ядерной мутации *pet494* (задача 7-37).



содержат все нормальные митохондриальные мРНК и образуют нормальные колонии при выращивании на несбраживаемых субстратах. Как это можно объяснить?

- 7-38 Эволюционные теории трудно проверить на клеточном уровне, поскольку невозможно получить необходимые данные на ископаемых остатках. Указания на эволюционное происхождение митохондрий и хлоропластов следует искать в живых организмах. Живые формы, сходные с древними типами, можно обнаружить и сегодня. Они являются удачными объектами для проверки эндосимбиотической теории происхождения митохондрий и хлоропластов. Например, плазматическая мембрана свободноживущих аэробных бактерий *Paracoccus denitrificans* содержит дыхательную цепь, почти идентичную дыхательной цепи митохондрий млекопитающих как по типам представленных в них компонентов, так и по их чувствительности к таким ингибиторам дыхания, как антимицин и ротенон. И действительно, нет сколько-нибудь существенной особенности дыхательной цепи млекопитающих, которая отсутствовала бы у *Paracoccus*. В этой бактерии собраны все те свойства митохондриальной внутренней мембраны, которые по частям встречаются у других аэробных бактерий.

Вообразите себя некоей протоэукариотической клеткой, подыскивающей все ценное для своей дальнейшей эволюции. Вы наблюдали за клетками *proto-Paracoccus* и поразились невероятно эффективному использованию ими кислорода для образования АТФ. Имея такой источник энергии, вы беспредельно расширили бы свои возможности для дальнейшего развития. И тогда вы решаете напасть на *proto-Paracoccus* и заставить его работать на себя и своих потомков. Вы хотите включить его в свою цитоплазму, питать его теми веществами, в которых он нуждается и пользоваться образуемой им АТФ. Итак, однажды темной ночью вы подкарауливаете одинокий *proto-Paracoccus*, окружаете его своей плазматической мембраной и таким образом превращаете в свой новый цитоплазматический компартмент. К вашему облегчению *proto-Paracoccus*, по-видимому, наслаждается новой средой. Однако после целого дня ожидания вы не чувствуете прилива сил. Какая ошибка вкралась в ваш замысел?

Внутриклеточная сортировка макромолекул и сохранение клеточных компартментов

Компартментация в клетках высших организмов (МБК 8.1)

8-1 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Внутреннее пространство любой внутриклеточной органеллы, называемое его _____, — это своего рода отдельный химический микрореактор, выполняющий специальные функции.
- Б. В секреторных клетках, например в экзокринных клетках поджелудочной железы, большие количества синтезируемых ими и предназначенных для выделения соединений накапливаются в _____, содержимое которых в ответ на внешний сигнал быстро выбрасывается из клеток.
- В. _____ секрета вызывается внешним сигналом, тогда как _____ секрета происходит непрерывно, при отсутствии стимулирующего фактора.
- Г. На некоторых этапах сортировки белков сигналом служит участок аминокислотной последовательности, называемый _____. Этот пептид часто отщепляется от синтезированного белка при поступлении его в соответствующие органеллы клетки.
- Д. На некоторых этапах сортировки белков соответствующие сигналы представляют собой трехмерную структуру на поверхности белковой молекулы; эти _____ обычно сохраняются в белке после завершения сортировки.

8-2 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните, почему.

- А. В эукариотической клетке площадь поверхности плазматической мембраны недостаточно велика, чтобы в ней могло разместиться столько молекул связанных с мембранами ферментов, сколько требуется для поддержания всех жизненных функций, обеспечиваемых мембранами в столь крупной клетке.
- Б. Внутренние мембраны делят клетку на функционально специализированные компартменты, ограниченные замкнутыми непроницаемыми мембранами.
- В. По площади поверхности и массе плазматическая мембрана — это минорная мембрана в большинстве эукариотических клеток.
- Г. Внутренние поверхности ядерной оболочки и мембраны эндоплазматического ретикула (ЭР) топологически эквивалентны наружной поверхности клетки.
- Д. Все белки, предназначенные для внутриклеточных, ограниченных мембранами компартментов, поступают по мере их синтеза внутрь ЭР и затем переносятся к местам использования.
- Е. Все секреторируемые белки проходят одинаковый путь от рибосом в полость ЭР и оттуда в аппарат Гольджи, а затем в секреторные везикулах выводятся из клетки.

- Ж. Чтобы эффективно функционировать, каждая транспортная везикула должна селективно поглощать только соответствующие белки и сливаться только с соответствующей мембраной-мишенью.
- З. Внутренние стороны мембран клеточных органелл, сообщающихся между собой с помощью транспортных везикул, топологически эквивалентны друг другу и наружной поверхности клетки.
- И. В зависимости от типа белка сигналом для его поступления в ЭР, митохондрии, хлоропласты или ядро служит сигнальный пептид или сигнальный участок.
- К. Сигнальные пептиды, присоединенные к белкам, имеющим одинаковое предназначение, функционально взаимозаменяемы, хотя их аминокислотные последовательности могут сильно варьировать.
- Л. Если ограниченная мембраной органелла, например ЭР или аппарат Гольджи, утрачена эукариотической клеткой, то последняя способна восстанавливать эту органеллу по информации, заключенной в ДНК.

8-3 Шероховатый эндоплазматический ретикулум (ЭР) — это место синтеза различных мембранных белков. Некоторые из них остаются в ЭР, другие распределяются по различным компартментам, например в аппарат Гольджи, лизосомы, плазматическую мембрану. Сложность проблемы сортировки зависит от того, какая степень «очистки» должна быть достигнута при переносе из ЭР в другие компартменты. Например, если мембранные белки, предназначенные для плазматической мембраны, составляют 90% всех имеющихся в ЭР белков, то требуется лишь небольшая степень очистки (и проблема сортировки данного белка представляется сравнительно легкой). С другой стороны, если белки плазматической мембраны составляют только 0,01% всех белков в ЭР, то понадобится значительная очистка (и проблема сортировки становится гораздо более трудной).

Каковы масштабы процессов сортировки? Какая доля мембранных белков, находящихся в ЭР, предназначается для других компартментов? Несколько простых допущений позволяют количественно оценить эти процессы. Предположим, что все белки на пути следования в другие компартменты остаются в ЭР в среднем в течение 30 мин до того, как выйдут из него, и что соотношение белков и липидов в мембранах всех клеточных органелл одинаково.

- А. В типичной растущей клетке, которая делится каждые 24 ч, через ЭР должны каждые сутки проходить все белки, необходимые для сборки новой плазматической мембраны. Если мембрана ЭР по площади в 20 раз больше плазматической мембраны, то каково соотношение между белками плазматической мембраны и другими мембранными белками в ЭР?
- Б. Если в одной и той же клетке площадь мембран аппарата Гольджи втрое больше площади плазматической мембраны, то каково соотношение между белками мембран Гольджи и другими мембранными белками в ЭР?
- В. Если площадь мембран всех других компартментов (лизосом, эндосом, внутренней ядерной мембраны, секреторных везикул), которые получают мембранные белки из ЭР, в сумме равна площади плазматической мембраны, то какова доля в ЭР тех мембранных белков этой клетки, которые постоянно присутствуют в мембране ЭР?

Цитозоль (МБК 8.2)

8-4 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. _____ определяет форму клетки, обеспечивает движение цитоплазмы и образует общую сеть, которая упорядочивает (организует) ферментативные реакции в цитозоле.
- Б. При _____ деградации белков (протеолизе) в эукариотических клетках многочисленные копии небольшого белка _____ ковалентно связываются с белком-мишенью, подлежащим деградации.
- В. Если клетки подвергаются воздействию повышенных температур или других неблагоприятных факторов, они начинают синтезировать специальный набор белков _____ (_____).

8-5 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Отдельные филаменты цитоскелета выполняют роль «рельсов», направляющих транспортные везикулы (пузырьки) к соответствующей мембране-мишени, с которой везикулы сливаются.
- Б. При всех посттрансляционных модификациях белков изменяется их ковалентная структура.
- В. Белки, прикрепленные к мембране при участии миристиновой кислоты, заякорены своим N-концом; белки, прикрепленные к мембране при участии пальмитиновой кислоты, заякорены вблизи своего C-конца.
- Г. Ключевые регуляторные белки, например такие, которые катализируют реакции, определяющие скорость метаболизма, обычно являются долгоживущими белками, что соответствует их особой важности для клетки.
- Д. Убикитин — это АТР-зависимая протеаза, которая быстро расщепляет белки, маркированные для деградации.
- Е. Наиболее надежный путь для выяснения полной аминокислотной последовательности цитозольного белка в его функциональной форме — это секвенирование его гена.

8-6 Время жизни молекулы белка обычно соответствует той функции которую он выполняет *in vivo*; например, структурные белки относятся к долгоживущим, тогда как регуляторные белки — это как правило, короткоживущие молекулы. Время жизни белка в эукариотической клетке может сильно зависеть от его N-концевой аминокислоты. В опытах, с помощью которых было показано влияние N-концевых аминокислот на стабильность белка, использовали гибридный белок, состоявший из убикитина, ковалентно сплитого с β -галактозидазой. Исследователи, обнаружившие это явление, изучили разнообразные плазмиды, кодирующие различные варианты гибридного белка. Три такие плазмиды схематически представлены на рис. 8-1. Когда эти плазмиды вводили

Рис. 8-1. Гибридные белки, кодируемые тремя дрожжевыми плазмидами (задача 8-6). При экспрессии в клетках дрожжей эти белки расщепляются по пептидным связям, указанным стрелкой. Молекулы β -галактозидаз, освобождающиеся при этом, различаются только по N-концам.

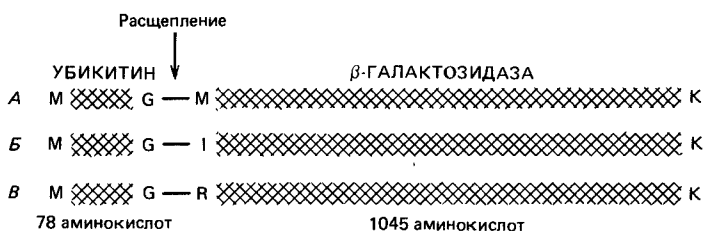


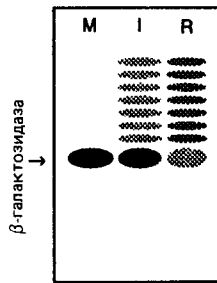
Рис. 8-
тремя
белкам
форет
активн
ченной
мощь
амино
столби
ции β-
шения
β-гала
центра
имевш
синтез

β-галакт

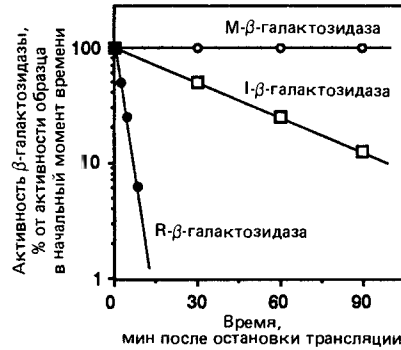
Рис. 8-
β-гала
взаимо
телами
Сократ
цевых
столби
β-гала

Рис. 8-2. Результаты опытов с тремя различными гибридными белками (задача 8-6). А. Электрофоретическое выделение радиоактивной β -галактозидазы, полученной путем осаждения с помощью антител, N-концевые аминокислоты указаны над каждым столбиком. Б. Динамика деградации β -галактозидазы после завершения синтеза белка. Уровень β -галактозидазы выражается в процентах от начального количества, имевшегося сразу после остановки синтеза белка.

А. АКРИЛАМИДНЫЙ ГЕЛЬ



Б. КИНЕТИКА РАСЩЕПЛЕНИЯ



в дрожжевые клетки, последние синтезировали гибридные белки, но убикитин отщеплялся (неидентифицированным ферментом) точно по месту его соединения с β -галактозидазой. В результате возникали молекулы β -галактозидаз с разными N-концами (см. рис. 8-1).

Чтобы оценить период полужизни этих β -галактозидаз, дрожжи выращивали на протяжении нескольких поколений в присутствии радиоактивной аминокислоты. Затем синтез белков блокировали с помощью соответствующего ингибитора. Для определения скорости деградации β -галактозидазы из культуры отбирали пробы в разные моменты времени, проводили очистку β -галактозидазы с помощью специфических антител и измеряли количество радиоактивной β -галактозидазы после гель-электрофореза с детергентом — додецилсульфатом натрия (ДСН). Результаты электрофореза для пробы, отобранной через 5 мин после добавления ингибитора, представлены на рис. 8-2, А. Динамика деградации за весь период отбора проб показана на рис. 8-2, Б.

- А. С помощью метода рекомбинантной ДНК можно было бы создать ряд плазмид с измененным первым кодоном гена β -галактозидазы. Как вы думаете, почему не был использован этот более прямой путь?
- Б. Оцените период полужизни трех различных видов β -галактозидаз (время, за которое деградирует половина материала).

8-7

Когда вы узнали о работе, описанной в предыдущей задаче, вас заинтересовали два аспекта представленных там данных. Во-первых, действительно ли убикитин удалялся с N-конца? Во-вторых, чему соответствуют полосы, расположенные над полосами β -галактозидазы на электрофореграмме (рис. 8-2, А)? Любые фрагменты β -галактозидазы, образующиеся при ее деградации, должны находиться на электрофореграмме ниже полосы β -галактозидазы.

Чтобы проверить, действительно ли β -галактозидаза высвобождается в результате отщепления убикитина от образовавшегося гибридного белка, вы выделяете с помощью антител нерадиоактивную β -галактозидазу из клеток, содержащих те же три плазмиды. Затем вы подвергаете эти образцы гель-электрофорезу с ДСН, переносите пластины геля на фильтровальную бумагу и проводите реакцию взаимодействия с радиоактивными антителами против убикитина. Как видно из рис. 8-3, антитела к убикитину не взаимодействовали с материалом, соответствующим полосе β -галактозидазы. Однако эти антитела взаимодействовали со всеми полосами, расположенными над β -галактозидазой. Рас-

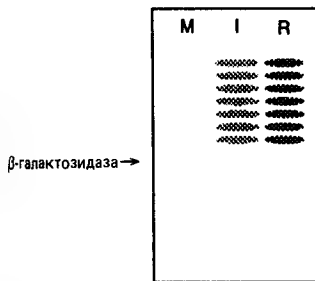


Рис. 8-3. Электрофорез меченой β -галактозидазы и последующее взаимодействие с мечеными антителами к убикитину (задача 8-7). Сокращенные обозначения N-концевых аминокислот указаны над столбиками. Положение нативной β -галактозидазы указано стрелкой.

положение этих полос было таким же, как и расположение полос на рис. 8-2, А.

- А. Показывают ли эти опыты, что убикитин отщепляется от N-конца гибридного белка?
- Б. Почему в случаях, когда на N-конце находились остатки изолейцина (I) или аргинина (R), убикитин присутствовал в полосах, расположенных выше полосы β -галактозидазы, а в тех случаях, когда на N-конце был остаток метионина (M), убикитин не обнаруживался?

8-8 Орнитиндекарбоксилаза (ОДКаза) катализирует первую реакцию в биосинтезе полиаминов, которые связываются с сахарофосфатным остовом молекул ДНК и РНК и играют существенную роль в процессах роста клеток. Активность ОДКаза регулируется обычно в соответствии с физиологическим состоянием клетки.

Представьте, что вы выделили мутантную линию клеток печени с гораздо более высокой, чем в норме, активностью ОДКаза. Ваши предварительные опыты позволяют предположить, что нормальные и мутантные клетки несут одинаковое число генов для ОДКаза, что эти гены транскрибируются с одинаковой скоростью и что нет явных различий в структурных и ферментативных свойствах ОДКаз из нормальных и мутантных клеток. Однако когда вы добавляете ингибитор синтеза белка, циклогексимид, и измеряете затем ферментативную активность в разные моменты времени, то обнаруживаете, что ОДКаза из мутантных клеток имеет период полужизни 12 ч вместо 14 мин, как у ОДКаза из обычных клеток. Период полужизни других белков у мутантной линии не изменялся.

- А. Если ОДКаза образуется с той же скоростью, что и в нормальных клетках, то почему в мутантных клетках активность этого фермента гораздо выше?
- Б. Каким образом можно было бы определить, чем обусловлена нестабильность ОДКаза в нормальных клетках: разрушением белка или инактивацией его в результате модификации (например, фосфорилирования, метилирования или ацетилирования)?
- В. Предполагая, что нестабильность ОДКаза в нормальных клетках объясняется деструкцией белка, предложите объяснение стабильности ОДКаза в клетках мутантной линии.

Транспорт молекул белков и РНК в ядро и из ядра (МБК 8.3)

8-9 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. _____ окружает ДНК и ограничивает клеточное ядро.
- Б. Ядро окружено двумя концентрическими мембранами: _____ мембраной, содержащей специфические белки, которые служат участками связывания прилегающего тонкого ядерного слоя, и _____ мембраной, непосредственно переходящей в мембрану ЭР.
- В. В ядре имеются перфорации — _____, каждая из которых встроена в крупную дисковидную структуру, называемую _____.
- Г. Селективность транспорта в ядро обеспечивается за счет сигналов для _____, которые имеются только в ядерных белках.

8-10 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

Рис. 8. Введение его схем авто и ядра мина

pNL
C
pNL
G

Рис. 8. дован жей (э

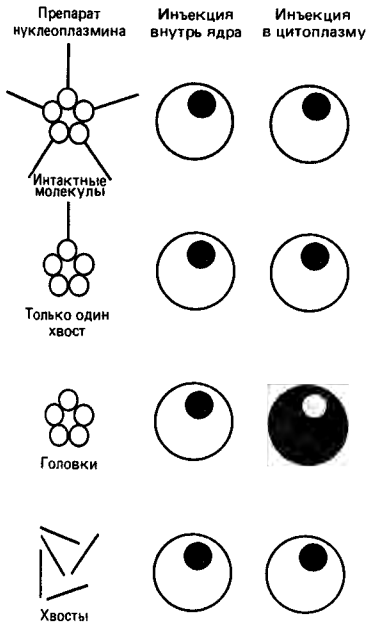


Рис. 8-4. Локализация в клетке введенных в нее нуклеоплазмينا и его компонентов (задача 8-11). На схематически изображенных радиоавтографах показаны цитоплазма и ядро. Локализация нуклеоплазмينا отмечена серым цветом.

- А. Перинуклеарное пространство непосредственно связано с просветом ЭР.
- Б. В области ядерной поры, как и в других местах, липидные бислои внутренней и наружной ядерных мембран отделены друг от друга.
- В. Поскольку молекулы ядерных белков неоднократно входят и выходят из ядра, их участки узнавания (сигналы) не отщепляются после переноса в ядро.
- Г. Для переноса белков в ядро необходимы специфические сигналы и затраты энергии (гидролиз АТФ), а для выхода РНК и субъединиц рибосом из ядра, по-видимому, не нужно никаких сигналов или затрат энергии.
- Д. Поскольку ядерная оболочка связана с мембраной ЭР, то сжатие или расширение ядра можно легко объяснить перетеканием мембран в ЭР и из него.

8-11 Теоретически белки могли бы накапливаться в ядре двумя путями. 1). Они могли бы проникать в ядро за счет пассивной диффузии и задерживаться там благодаря связыванию с постоянными компонентами ядра, например с хромосомами. 2). Перенос белков в ядро мог бы осуществляться путем активного транспорта, и их накопление не зависело бы от сродства к компонентам ядра. Провести различие между пассивной диффузией и активным транспортом очень трудно, так как большинство, если не все белки в ядре прямо или опосредованно связаны с ядерными компонентами. Хотя часто утверждают, что физический размер ядерной поры (кажущийся диаметр 9 нм) благоприятствует активному транспорту, однако такую аргументацию нельзя считать удовлетворительной, поскольку форма молекул для большинства ядерных белков неизвестна.

В одном из экспериментов, проведенном для разрешения этой проблемы, использовали радиоактивный нуклеоплазмин крупный пентамерный белок, участвующий в сборке хроматина, а также составляющие его элементы. В разных вариантах опыта в цитоплазму или в ядро ооцита лягушки были инъецированы: нативный белок, «головки» молекулы, «хвосты» молекулы и головки плюс один хвост (рис. 8-4). Все элементы молекулы нуклеоплазмينا, кроме головок, накапливались в ядре, если были введены в цитоплазму, и все они оставались в ядре, если были введены в него.

- А. Какая часть молекулы нуклеоплазмينا ответственна за его локализацию в ядре?
- Б. Каким образом с помощью этих опытов можно определить механизм переноса: активный ли это транспорт, который запускается сигналом для переноса в ядро и идет через поровый комплекс ядерной оболочки, или же пассивная диффузия, при которой накопление белка в ядре происходит за счет связывания с компонентом ядра.

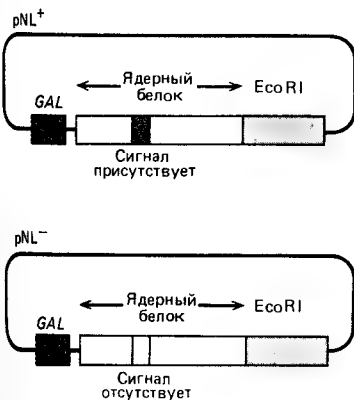


Рис. 8-5. Две плазмиды для исследования транспорта в ядро у дрожжей (задача 8-12).

8-12 Вы приступили к работе в лаборатории, где занимаются изучением механизма ядерного транспорта у дрожжей. Ваш руководитель — сотрудница, известная своими оригинальными идеями, — предложила вам очень перспективный план. Он позволит провести генетический отбор условно-летальных мутантов по механизму ядерного транспорта.

Руководитель предоставила вам две плазмиды (схематически изображенные на рис. 8-5). Каждая из них содержит гибридный ген, находящийся под контролем регулируемого промотора. Гибридный ген образовался в результате слияния гена, продукт

Таблица 8-1. Результаты опытов по выращиванию дрожжей, несущих плазмиды pNL⁺ или pNL⁻ (задача 8-12)

Плаз-мида	Среда с глюкозой	Среда с галактозой
pNL ⁺	Рост	Гибель
pNL ⁻	Рост	Рост

которого нормально импортируется в ядро, с геном для рестриктазы EcoRI. В плазмиде pNL⁺ закодирован функциональный сигнал для ядерного импорта, а в плазмиде pNL⁻ – тот же сигнал в нефункциональной форме. Промотор из дрожжевого гена *GAL1* обеспечивает транскрипцию гибридного гена при особом условии: в среде для культивирования должна быть галактоза.

Следуя советам руководителя, вы ввели эти плазмиды в дрожжи (в отсутствие галактозы), а затем исследовали рост трансформированных дрожжей на среде с глюкозой и на среде с галактозой. Результаты эксперимента представлены в табл. 8-1. Вы не помните, что говорила руководитель по поводу ожидаемых результатов, но знаете, что от вас ждут сообщения на лабораторном семинаре в конце недели. Почему дрожжи с плазмидой pNL⁺ растут в присутствии глюкозы, но гибнут в среде с галактозой?

- 8-13** Когда вы поняли, почему плазида pNL⁺ (рис. 8-5) вызывает гибель клеток в среде с галактозой, для вас становится ясным, каким образом ваш руководитель намеревается использовать свойства этой плазмиды для отбора мутантов с изменениями в механизме ядерного транспорта. Вы начинаете также понимать, почему она подчеркивала, что мутанты должны быть *условно-летальными*. Поскольку ядерный транспорт необходим для клетки полностью дефектный мутант не смог бы расти и его невозможно было бы исследовать. Напротив, условно-летальные мутанты могут хорошо расти при тех или иных условиях (*разрешающие условия*); при других условиях (*ограничивающие условия*) проявляется дефект клеток, который можно тогда исследовать.

На основе этой общей стратегии вы разрабатываете схему отбора клеток, мутантных по механизму ядерного транспорта и чувствительных к температуре (*ts*). Вы хотите найти мутанты, которые хорошо растут при низкой температуре (*разрешающие условия*), но плохо – при высокой температуре (*ограничивающие условия*). Вы планируете индуцировать мутации в клетках с плазмидой pNL⁺ при низкой температуре, а затем перевести их в условия высокой температуры и среду с галактозой. Вы считаете, что при ограничивающей температуре мутанты по ядерному транспорту не будут поглощать белок-убийцу, кодируемый плазмидой pNL⁺, а потому не погибнут. В нормальных же клетках будет происходить транспорт белка-убийцы в ядро, и они погибнут. После инкубации в течение 1–2 ч при высокой температуре, в время которой нормальные клетки должны погибнуть, вы намереваетесь понизить температуру и поместить выжившие клетки на пластинки питательного агара, содержащего глюкозу. Вы предполагаете, что мутанты по ядерному транспорту реактивируются при низкой температуре и дадут колонии.

Когда вы показываете схему опыта руководителю, она с воодушевлением одобряет ваш план, однако отмечает в нем существенный недостаток, который может помешать выделению мутантов по транспорту в ядро. Подсказывать руководителю не хочет. Она считает, что студенты лучше овладевают предметом, когда действуют самостоятельно.

- В чем заключается основная ошибка в плане эксперимента?
- Как следует изменить план, чтобы исправить недостаток?
- Если действовать по исходному плану, то можно ли подозревать, что какие-то другие типы мутантов (не имеющих отношения к ядерному транспорту) смогут выжить при данном способе отбора?

Транспорт белков в митохондрии и хлоропласты (МБК 8.4)

8-14 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. В митохондрии имеется четыре внутренних компартмента: _____, _____, _____, _____ (в направлении изнутри наружу).
- Б. В хлоропластах имеется два дополнительных внутренних компартмента: _____ и _____.
- В. Белки цитозоля, предназначенные для импорта в митохондрии, называются _____.
- Г. Считается, что импорт внутрь матрикса происходит в _____, где внутренняя и наружная мембраны митохондрии, по-видимому, соединяются.
- Д. В хлоропластах имеется дополнительный, ограниченный мембраной компартмент, называемый _____.

8-15 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Относительно немногочисленные белки, закодированные в геномах митохондрий и хлоропластов, локализованы в основном во внутренних мембранах этих органелл.
- Б. Митохондриальные сигнальные пептиды представляют собой амфипатические α -спиральные структуры с положительно заряженными аминокислотными остатками на одной стороне и отрицательно заряженными аминокислотными остатками на другой стороне спирали.
- В. Движущей силой процесса встраивания митохондриального сигнального пептида в наружную митохондриальную мембрану во время проникновения белка-предшественника в митохондрию служит, по-видимому, электрохимический протонный градиент.
- Г. Поскольку N-конец импортируемого белка может расщепляться протеазой матрикса, а его С-конец доступен для действия наружных протеаз, белки-предшественники, по-видимому, проникают через наружную и внутреннюю мембраны одновременно.
- Д. Свернутое состояние пептидной цепи белка характеризуется более низкой свободной энергией, чем развернутое, поэтому разворачивание молекулы белка при переносе его в митохондрию связано с затратами энергии.
- Е. Белки, предназначенные для внутренней митохондриальной мембраны, по-видимому, проходят через наружную и внутреннюю мембраны в матрикс, а затем встраиваются во внутреннюю мембрану.
- Ж. Поскольку в наружной мембране митохондрий имеются очень крупные поры, она не является преградой для белков.
- З. Как в хлоропластах, так и в митохондриях движущей силой транспорта белков-предшественников через наружную и внутреннюю мембраны служит электрохимический протонный градиент.

8-16 Изучая импорт белков в митохондрии, вы обрабатывали клетки дрожжей циклогексимином, блокирующим движение рибосомы по мРНК. При исследовании этих клеток с помощью электронного микроскопа вы с удивлением обнаруживаете, что цитозольные рибосомы прикреплены к внешней поверхности митохондрий. В отсутствие циклогексимида прикрепленных рибосом никогда не наблюдалось. Чтобы выяснить причину этого явления, вы препаративно выделяете митохондрии из клеток, обработанных цикло-

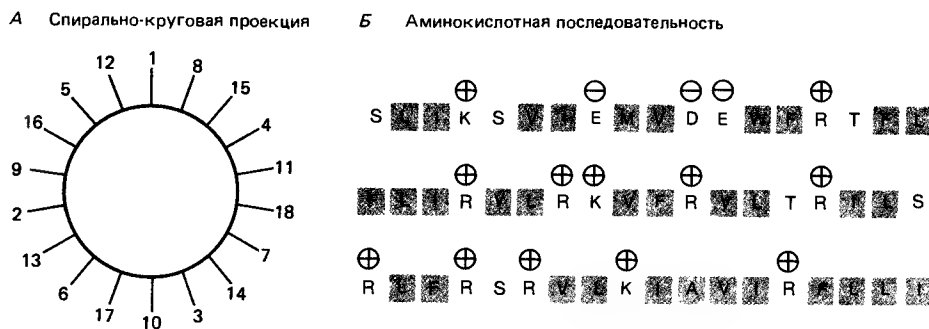


Рис. 8-6. Возможные сигнальные пептиды для импорта в митохондрии (задача 8-17). А. Спирально-круговая проекция α -спирали. Числа показывают положения первых 18 аминокислот α -спирали; аминокислота 19 должна занимать такое же положение на проекции, что и аминокислота 1. Б. Аминокислотные последовательности трех пептидов. Н-концы расположены слева; гидрофобные аминокислоты показаны серым цветом; заряд на заряженных аминокислотах указан в кружке сверху; незаряженные гидрофильные аминокислоты не имеют дополнительных обозначений.

гексими́дом, и экстрагируете мРНК, связанную с рибосомами, прикрепленными к наружной поверхности митохондрий. Вы транслируете эту мРНК *in vitro* и сопоставляете ее белковые продукты с продуктами мРНК из цитозоля, транслированной таким же образом. Результаты четко показывают: рибосомы, связанные с мембранами митохондрий, транслируют те мРНК, в которых закодированы митохондриальные белки.

Вы поражены! Подтверждается то, что было хорошо видно на электронных фотомикрографиях: импорт белков в митохондрию происходит во время трансляции. Как можно соотнести эти результаты с преобладающей точкой зрения, что импорт митохондриальных белков осуществляется после того, как синтез закончен и они отделены от рибосом?

8-17 Основная особенность сигнальных пептидов, используемых для импорта белков в митохондрии, — это их организация в виде амфипатической спирали. Спираль является амфипатической, если одна сторона ее гидрофильная, а другая гидрофобная. Вопрос о том, может ли данная последовательность аминокислот образовать амфипатическую спираль, решается путем расположения аминокислот вокруг так называемой «спирально-круговой проекции» (рис. 8-6, А). На рисунке изображено положение аминокислот вокруг α -спирали (вид сверху). Если на такой схеме гидрофобные аминокислоты чередуются с гидрофильными, то спираль не является амфипатической; если же гидрофобные аминокислоты расположены с одной стороны, а гидрофильные аминокислоты — с противоположной, то спираль амфипатическая.

Определите с помощью спирально-круговой проекции, какой из трех пептидов, изображенных на рис. 8-6, Б, может образовать амфипатическую спираль, способную служить сигналом для импорта белка в митохондрии.

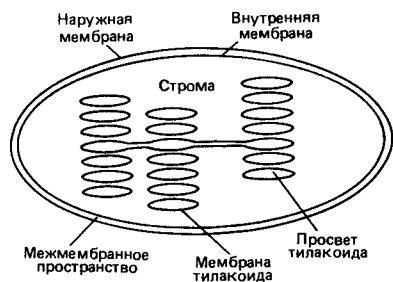


Рис. 8-7. Шесть компартментов хлоропластов (задача 8-18).

8-18 В хлоропластах имеется шесть компартментов: наружная мембрана, межмембранное пространство, внутренняя мембрана, строма, тилакоидная мембрана, просвет тилакоида (рис. 8-7); для каждого из них характерен специфический набор белков. Многие из этих белков закодированы в ядерных генах. Они транслируются в цитоплазме и затем направляются в соответствующий компартмент хлоропласта. Чтобы изучить импорт белков в хлоропласты, вы провели клонирование ДНК для ферредоксина (ФД), который локализован в строме, и для пластоцианина (ПЦ), который локализован в просвете тилакоида. Далее, используя метод рекомбинантной ДНК, вы сконструировали два гибридных гена: ген, кодирующий ФД + сигнальный пептид ПЦ, (ПЦФД) и ген, кодирующий ПЦ + сигнальный пептид ферредоксина, (ФДПЦ). Затем вы проводите *in vitro* трансляцию мРНК от этих четырех генов

Рис. 8-8
и пласт
хлороп
обработ
(А), а э
методом
Каждая
в (Б) со
экспери
столбце

А. ПРОТОКОЛ ЭКСПЕРИМЕНТА

ТРАНСЛЯЦИЯ мРНК
IN VITRO
↓
ДОБАВЛЕНИЕ
ХЛОРОПЛАСТОВ
↓
ОБРАБОТКА ПРОТЕАЗОЙ,
ПОВТОРНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ
ХЛОРОПЛАСТОВ
↓

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ
ХЛОРОПЛАСТОВ

↘
Внутренние
и наружные
мембраны

Строма

Тилакоиды

Тилакоиды +
протеаза

Б. ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

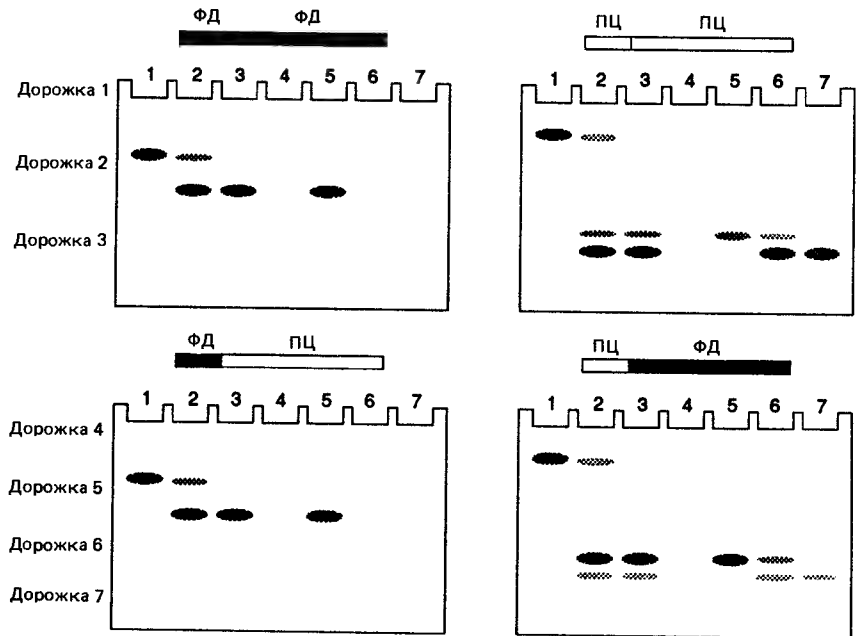


Рис. 8-8. Импорт ферредоксина и пластоцианина в компартменты хлоропласта (задача 8-18). Образцы обработаны как указано в столбце (А), а затем проанализированы методом гель-электрофореза (Б). Каждая пронумерованная дорожка в (Б) соответствует определенной экспериментальной обработке в столбце (А).

смешиваете продукты трансляции с выделенными хлоропластами на несколько минут, снова выделяете хлоропласты после обработки протеазой и фракционируете их, чтобы установить, в какие компартменты попали продукты трансляции. На рис. 8-8 представлены электрофореграммы этих белков для каждого этапа опыта и каждой фракции хлоропластов.

- Насколько эффективным было поглощение хлоропластами ферредоксина и пластоцианина в вашей системе in vitro?
- Локализованы ли ферредоксин и пластоцианин в характерных для них компартментах хлоропластов? Позволяют ли ваши экспериментальные данные ответить на этот вопрос?
- Импортируются ли гибридные белки в соответствии с вашим замыслом (если N-концевые сигнальные пептиды определяют их конечную локализацию)? Объясните наблюдаемые отклонения от ожидавшегося результата.
- Почему в опытах с пластоцианином и ПЦФД обнаруживается три, а в опытах с ферредоксином и ФДПЦ – две полосы?
- Попытайтесь на основании своих опытов предложить модель импорта белков в строму и в просвет тилакоида.

Пероксисомы (МБК 8.5)

8-19 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- _____, которые называются также микротельцами, сходны с ЭР тем, что представляют собой самореплицирующиеся, окруженные мембраной органеллы, не содержащие собственного генома.
- Растения, но не животные, могут превращать жирные кислоты в сахара в результате последовательности реакций, называемой _____; пероксисомы, в которых эти реакции протекают, называют также _____.

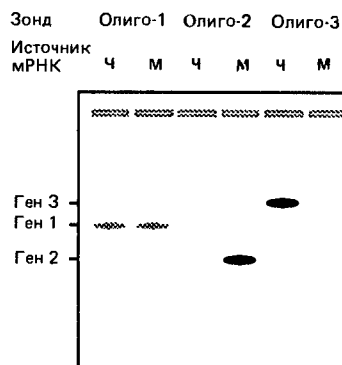


Рис. 8-9. Гибридизация специфических олигонуклеотидных зондов с мРНК трипаносом, выделенных из человека (Ч) и из мухи цеце (М) (задача 8-21). Интенсивность полос на радиоавтограмме отражает концентрацию мРНК.

8-20 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие – нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Пероксисомы характерны для немногих типов клеток млекопитающих.
- Б. Реакции пероксисомного окисления имеют особое значение в клетках печени и почек, где пероксисомы обезвреживают разнообразные токсичные соединения, попадающие в кровоток.
- В. Мембранная оболочка пероксисомы образуется в результате отделения везикул от ЭР, тогда как их внутреннее содержимое импортируется из цитозоля.

8-21 Трипаносомы – это одноклеточные паразиты, которые вызывают у человека сонную болезнь. У трипаносом, выделенных из человека, часть ферментов гликолиза содержится в органелле, напоминающей пероксисому и называемой гликосомой. В противоположность этому у трипаносом, выделенных из промежуточного хозяина, мухи цеце, гликолиз происходит полностью в цитозоле. Это загадочное различие вызвало интерес у фармацевтической компании, в которой вы работаете. Компания хотела бы использовать это различие для разработки средства борьбы с заболеванием.

Вы решаете исследовать фермент фосфоглицераткиназу (ФГК) потому что этот фермент относится к той части гликолиза которой касается указанное различие. У трипаносом из мухи цеце вся ФГК обнаруживается в цитозоле, тогда как у трипаносом выделенных из организма человека, 90% всей активности фермента обнаруживается в гликосомах и лишь 10% – в цитозоле. Когда вы клонируете гены ФГК из трипаносом, то находите три формы белка, несколько различающиеся между собой. Исходя из этих небольших различий, вы получаете три олигонуклеотида, которые специфически гибридизуются с мРНК от каждого гена. Используя эти олигонуклеотиды как маркеры, вы определяете, какие гены экспрессируются трипаносомами из человека и какие – трипаносомами из мухи цеце. Результаты представлены на рис. 8-9.

- А. Какие гены ФГК экспрессируются в трипаносомах, выделенных из человека? Какие гены ФГК экспрессируются в трипаносомах выделенных из мухи цеце?
- Б. Какой ген ФГК вероятнее всего кодирует гликосомную форму ФГК?
- В. Не кажется ли вам, что минорная активность ФГК в цитозоле трипаносом из человека объясняется неточностью их сортировки в гликосомы? Объясните ваш ответ.

8-22 Существуют различные представления о процессе образования пероксисом. Некоторые исследователи полагают, что пероксисомы отпочковываются от ЭР, однако прямых доказательств этого нет. Другие ученые убедительно доказывают, что пероксисомы – это самореплицирующиеся органеллы. Для подтверждения этой гипотезы используют результаты трех наблюдений: 1) все известные пероксисомные белки импортируются из цитозоля; 2) эти белки не связаны с углеводами и 3) мембраны пероксисом не содержат в значительных количествах белков, входящих в состав мембраны ЭР.

Можно ли провести эксперимент, позволяющий однозначно определить происхождение мембран пероксисом?

Один из возможных тестов основывается на том известном факте, что пероксисомы совершенно отсутствуют при летальной наследственной болезни человека, известной как синдром Целлвега.

гера. Если бы клетки, собранные от разных больных, были дефектны по разным генам, то каким образом эксперимент по слиянию двух таких клеток мог бы помочь в выборе одной из двух гипотез? Какой результат вы предсказали бы, если пероксисомы происходят из ЭР? Какой результат можно было бы ожидать, если пероксисомы образуются из предшествующих пероксисом?

Эндоплазматический ретикулум (МБК 8.6)

8-23 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Мембрана _____ обычно составляет более половины массы всех мембран клетки, а внутреннее пространство, называемое _____, часто занимает более 10% всего обмена клетки.
- Б. _____, синтезирующие белки, которые сразу же перемещаются в ЭР, покрывают его поверхность и создают области, называемые _____.
- В. Транспортные везикулы, несущие новосинтезированные белки и липиды, отщипываются от _____ для транспорта указанных молекул в аппарат Гольджи.
- Г. В мышечных клетках имеется специализированная органелла, подобная хорошо развитому гладкому ЭР, которая называется _____; в нем накапливается и секвестрируется Ca^{2+} , поступающий из цитозоля.
- Д. При разрушении клеток путем гомогенизации, ЭР распадается на множество мелких замкнутых пузырьков, называемых _____.
- Е. В _____ постулируется, что N-концевая лидерная последовательность служит сигнальным пептидом, который направляет секреторируемый белок к мембране ЭР.
- Ж. Сигнальный пептид направляется к мембране ЭР при участии по крайней мере двух компонентов системы узнавания: _____, которая связывается с сигнальным пептидом в цитозоле, и _____, который расположен в мембране ЭР.
- З. Большинство N-концевых сигнальных пептидов отщепляется специфической _____, связанной с мембраной ЭР.
- И. В молекулах трансмембранных белков, многократно пронизывающих мембрану, основной единицей переноса является полипептидная петля между _____ и _____. Оба сигнальных пептида в полностью синтезированной молекуле белка служат доменами, перешнуровывающими мембрану.
- К. В просвете ЭР содержится в высокой концентрации _____, который, по-видимому, узнает неверно свернутые белки, возможно, путем связывания с их доступными гидрофобными поверхностями.
- Л. Фермент _____ одну за другой расщепляет S—S-связи, позволяя белкам быстро выбрать из разных структур вариант с низкой свободной энергией.
- М. Большинство белков, скапливающихся в просвете ЭР,—это _____, которые несут ковалентно связанные сахара.
- Н. При _____ белка ранее образованный олигосахарид-предшественник переносится целиком (*en bloc*) от специальной липидной молекулы, _____, на остаток аспарагина в белке-мишени.

8-24 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие—нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. В клетках млекопитающих импорт белков в просвет ЭР начинается еще до того, как синтез полипептидной цепи полностью завершен, т.е. импорт происходит котрансляционно.
- Б. Свободные рибосомы и мембраносвязанные рибосомы идентичны.
- В. Детоксикация, осуществляемая ферментами семейства цитохрома Р450, включает расщепление токсичных соединений или метаболитов на такие мелкие единицы, которые могут выделяться с мочой.
- Г. Шероховатые микросомы могут быть легко отделены от гладкой микросомы, потому что из-за более высокой концентрации белков плотность первых выше.
- Д. Хотя гладкий ЭР и шероховатый ЭР непрерывно переходят друг в друга, в шероховатом ЭР содержатся многие белки, которых нет в гладком ЭР.
- Е. Если какой-либо белок, в норме секретируемый клеткой, синтезируется *in vitro* в присутствии микросом, он будет защищен от воздействия добавленной в среду протеазы.
- Ж. В момент выхода из рибосомы сигнальный пептид связывается с гидрофобным участком на рибосоме, вызывая остановку трансляции; последняя возобновляется, когда частица, узнающая сигнал, связывает этот сигнальный пептид.
- З. Рибосомы шероховатого ЭР используют энергию, высвобождающуюся при белковом синтезе, для продвижения растущих полипептидных цепей через мембрану ЭР.
- И. Независимо от топологии белка в мембране N-конец отщепленной сигнальной последовательности никогда не выступает в просвет ЭР.
- К. В молекуле белка с несколькими гидрофобными сегментами пронизывающими мембрану, нечетные сегменты (если считать от N-конца полипептидной цепи) действуют как пептиды «начала переноса», а четные — как пептиды «конца переноса».
- Л. Путем присоединения к развернутой цепи связывающий белок (BiP), вероятно, помогает удерживать неправильно свернутые белки в ЭР и, таким образом, вне аппарата Гольджи.
- М. В просвете ЭР содержится смесь восстанавливающих агентов, содержащих тиоловые группы; эти вещества препятствуют образованию S-S-связей (дисульфидных мостиков), поддерживая окислительное состояние цистеина в составе белков в восстановленной (—SH) форме.
- Н. Олигосахариды в составе гликопротеинов связаны с белками через атомы N гораздо чаще, чем через атомы O.
- О. Некоторые мембранные белки прикреплены к поверхности плазматической мембраны, обращенной в сторону цитоплазмы, благодаря связыванию C-конца с гликозилированной молекулой фосфатидилинозитола.
- П. Первоначальное образование фосфатидной кислоты и ее последующие модификации с образованием других фосфолипидных молекул происходят в той половине липидного бислоя ЭР, которая обращена к цитозолю.
- Р. Фосфолипиды присоединяются к ЭР, а затем переносятся в другие ограниченные мембранами компартменты клетки с помощью транспортных везикул.

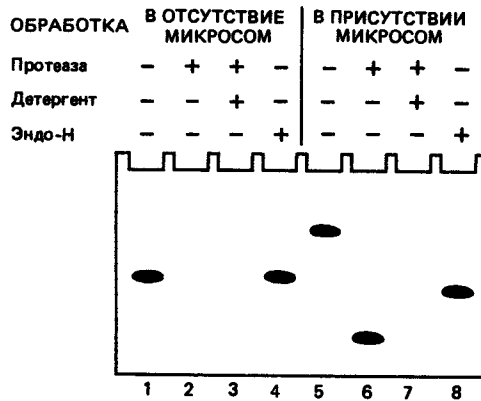
8-25 Перенос белков через мембрану ЭР обычно изучают на микросомах — везикулах, образующихся из мембран ЭР в процессе выделения. Микросомы, образовавшиеся из шероховатого ЭР, несут рибосомы, прикрепленные к их внешней поверхности. Перенос белков через мембраны микросом можно оценить по нескольким

Рис. 8-10. трансляции. присутствие сомных м. Вариант трансляции. форезом. полиакри. в котором основе их с более н. сой оказы



Рис. 8-11. гена для трансляции (рис. 8-26). Кисти д. делах б. промото. в мален. Места р. ментами. стрелка. ражены. дукты т. расщепл.

Рис. 8-10. Результаты опыта по трансляции очищенной мРНК в присутствии и в отсутствие микросомных мембран (задача 8-25). Вариант обработки продуктов трансляции перед гель-электрофорезом указан над каждой дорожкой. Электрофорез проводили в полиакриламидном геле с ДСН, в котором белки разделяются на основе их размеров, так что белки с более низкой молекулярной массой оказываются дальше от старта.



экспериментальным критериям: 1) защищенность вновь синтезированного белка от экзогенно добавляемых протеаз и незащищенность от протеаз в присутствии детергентов, используемых для растворения защитного липидного бислоя; 2) гликозилирование вновь синтезированных белков олигосахаридтрансферазами, локализованными исключительно в просвете ЭР; 3) отщепление сигнальных пептидов сигнальной пептидазой, которая тоже активна только на поверхности мембраны ЭР, обращенной в просвет ЭР.

Вы хотите использовать эти критерии, чтобы выяснить, переносится ли синтезированный на очищенной мРНК белок через микросомную мембрану. Для этого вы транслируете мРНК в белок в бесклеточной системе в присутствии микросом и без них. Затем вы проводите опыт в 4 вариантах:

1) без обработки; 2) добавление протеазы; 3) добавление протеазы и детергента и 4) разрушение микросом и добавление эндогликозидазы Н (эндо-Н), которая отщепляет N-связанные сахара, соединенные с ЭР. Электрофоретический анализ этих препаратов показан на рис. 8-10.

- Объясните экспериментальные результаты для вариантов, в которых микросом в инкубационной среде не было (рис. 8-10, дорожки 1-4).
- Используя три критерия, перечисленные в этой задаче, решите, указывают ли данные, полученные в вариантах, где были добавлены микросомы (рис. 8-10, дорожки 5-8), на то, что белок переносится через микросомную мембрану. Объясните перемещение белков, соответствующее дорожкам 5, 6 и 8.
- Заякоривается ли белок в мембране или полностью переносится через нее?

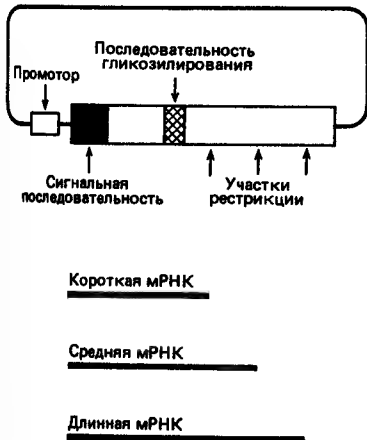


Рис. 8-11. Схема клонированного гена для изучения сопряжения трансляции и транслокации (задача 8-26). Кодировочные последовательности для белков находятся в пределах большого прямоугольника; промоторная последовательность — в маленьком прямоугольнике слева. Места расщепления матрицы ферментами рестрикции указаны стрелками. Под картой гена изображены три молекулы мРНК — продукты транскрипции по-разному расщепленных матриц.

8-26 Поступление секреторных и мембранных белков в просвет ЭР, как правило, прочно сопряжено с белковым синтезом. Котрансляционный характер переноса (транслокации) у эукариот дает возможность применять чувствительный и специфический способ изучения ранних этапов биосинтеза этих белков. Однако это же создает серьезную трудность при выяснении механизма переноса. Например, в такой сопряженной системе трудно определить, «проталкивают» ли рибосомы белок сквозь мембрану, или он «протягивается» через нее за счет механизма переноса.

С целью разобщить трансляцию и транслокацию вы осуществили клонирование гена в плазмиде рядом с промотором для РНК-полимеразы бактериофага (рис. 8-11). Такое расположение позволяет получить транскрипцию гена *in vitro* при добавлении

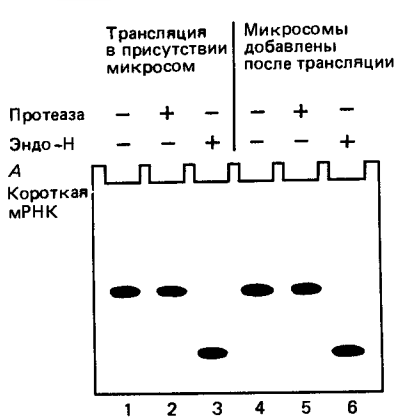


Рис. 8-12. Результаты опытов по изучению сопряжения трансляции и транслокации (задача 8-26). Показаны результаты с короткой (А), средней (Б) и длинной (В) мРНК. Вариант обработки образцов перед электрофорезом указан над схемой геля. Эндо-Н удаляет сахара, присоединенные к белкам в ЭР.

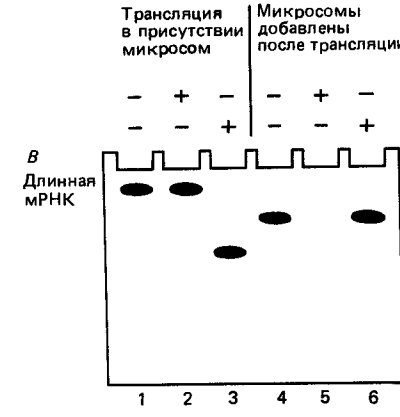
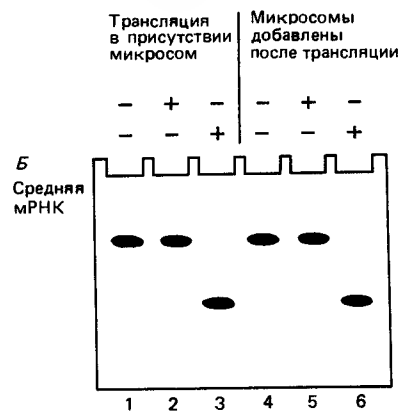


Рис. 8-13. Р...

фаговой РНК-полимеразы. Кроме того, путем разрезания плазмиды в разных сайтах внутри гена вы можете создавать более короткие мРНК по сравнению с нормальными (рис. 8-11). Вы приготовили три мРНК, показанные на рис. 8-11, и провели их трансляцию *in vitro*. В одном варианте опыта вы добавили микросомы до начала трансляции. Во втором варианте вы добавили микросомы после завершения трансляции (вместе с циклогексимидом, нужным для подавления любого дополнительного белкового синтеза). Чтобы выявить транслокацию, вы обрабатывали некоторые пробы протеазой либо разрушали микросомы и проводили обработку эндогликозидазой Н (эндо-Н), а затем с помощью гель-электрофореза с ДСН выявляли образовавшиеся продукты (рис. 8-12).

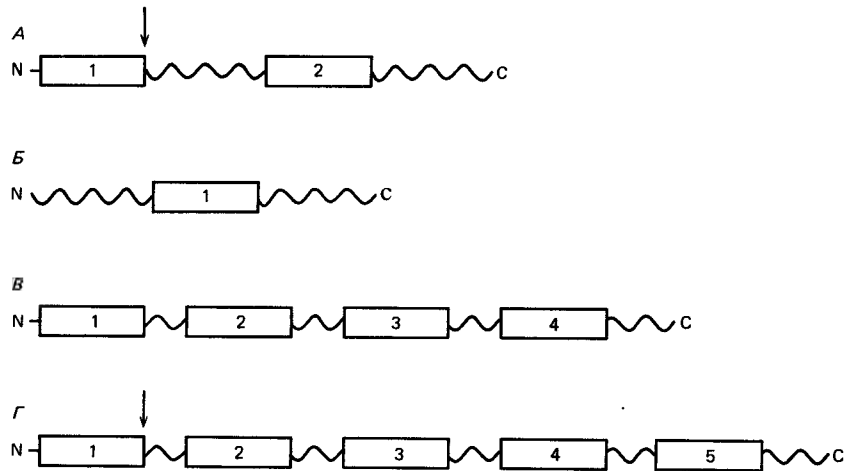
- А. Переносятся ли белки от каждой мРНК в микросомы, когда трансляция происходит в присутствии микросом?
- Б. Удалось ли вам получить разобщение транслокации и трансляции в каком-нибудь из вариантов? Объясните ваш ответ.
- В. Подтверждают ли полученные результаты идею о том, что рибосомы проталкивают белки сквозь мембрану ЭР, или же они указывают на то, что белки протягиваются через мембрану благодаря механизму переноса?
- Г. Почему перенос более коротких белков может происходить независимо от трансляции, а перенос более длинных белков – нет?

8-27 Хотя точный механизм котрансляционного встраивания белков в мембраны не известен, можно предсказать окончательное расположение белка в мембране, если известны его сегменты, пронизывающие мембрану. Если пронумеровать эти сегменты с N-конца то нечетные начинают транслокацию (действуя, как пептиды «начала переноса»), а четные заканчивают ее (действуя, как пептиды «конца переноса»). Далее, поскольку пептиды погружаются в мембраны, как шпильки в волосы, пептиды начала переноса ориентируются своими N-концами в сторону цитоплазмы, а С-концами – к просвету ЭР. Благодаря такой ориентации сегментов начала переноса фиксируется противоположная ориентация сегментов конца переноса, так что их N-концы направлены в сторону просвета ЭР, а С-концы – к цитоплазме.

На рис. 8-13 схематически изображены четыре мембранные белка. Прямоугольниками изображены сегменты, пронизывающие мембрану, стрелки указывают места отщепления лидерных пептидов. Предскажите на основе описанного выше механизма котран-

Рис. 8-14. бранного

Рис. 8-13. Распределение пронизывающих мембрану сегментов в белках, которые нужно встроить в мембрану ЭР (задача 8-27). Прямоугольниками изображены эти сегменты, а стрелками указаны места полипептидной цепи, где отщепляются сигнальные пептиды.



ляционного встраивания, каким образом каждый из белков будет располагаться в мембране ЭР. Укажите, как ориентированы N- и C-концы по отношению к цитоплазме и просвету ЭР.

- 8-28** Вас заинтересовало, что расположение белка в мембране в принципе может определяться самой последовательностью аминокислотных остатков. График гидропатии аминокислотных остатков вдоль цепи можно использовать для идентификации гидрофобных областей, которые, вероятно, соответствуют сегментам цепи, пронизывающим мембрану. На основе правил котрансляционного встраивания вы могли бы предсказать, какие участки белка будут выступать в цитоплазму, а какие — на поверхность клетки. Вы хотите проверить свои предположения на *E. coli*, объекте, позволяющем привлечь для решения проблемы мощные средства генетического анализа.

В качестве тестового белка вы выбираете мембранный белок с известной аминокислотной последовательностью, который клонируете с помощью плазмиды.

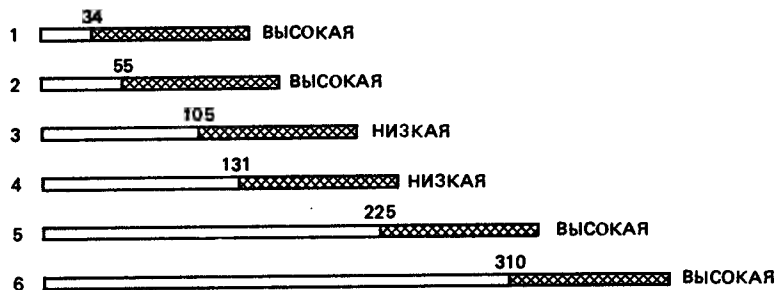
График показателя гидропатии этого белка представлен на рис. 8-14. Вы хотите проверить свои предсказания, получив гибридные белки, которые состоят из мембранного белка на N-конце и щелочной фосфатазы на C-конце. Щелочную фосфатазу легко определять в целых клетках, и в ее молекуле нет сколько-нибудь протяженных гидрофобных участков. Более того, когда она локализована на цитоплазматической стороне мембраны, ее активность низка, а когда она располагается на внешней стороне мембраны (в периплазматическом пространстве), ее активность высока.



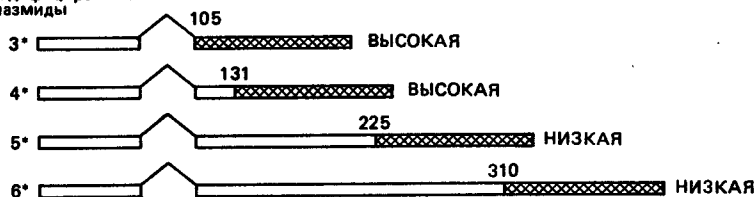
Рис. 8-14. График гидропатии мембранного белка (задача 8-28).

Рис. 8-15. Структуры гибридных белков для проверки предсказаний о расположении белков в мембране, сделанных на основе данных по гидропатии (задача 8-28). Мембранный белок (незаштрихованный сегмент) расположен у N-конца, а щелочная фосфатаза (заштрихованный сегмент) — у С-конца гибридной молекулы. Участки аминокислот, отсутствующих в модифицированных гибридных белках, указаны перевернутыми V-образными знаками. Ближайшие к С-концу аминокислоты мембранного белка пронумерованы. Активность щелочной фосфатазы для каждого гибридного белка указана справа.

Конструкция плазмид



Модифицированные плазмиды



Вы выделяете шесть гибридных белков, состоящих из различных фрагментов мембранного белка и щелочной фосфатазы. Структуры этих белков (с указанием номера для С-концевой аминокислоты мембранного белка) и уровень активности щелочной фосфатазы (высокая или низкая) представлены на рис. 8-15. В качестве дополнительного теста вы используете два удобных расположенных участка рестрикции в гене для мембранного белка, чтобы получить делеции фрагментов, с которыми удаляются кодоны для аминокислот от номера 68 до номера 103. На рис. 8-16 эти модифицированные плазмиды также представлены.

- Какое расположение белка в мембране можно предсказать из данным графика гидропатии на рис. 8-14? Насколько оно совпадает с результатами, полученными на гибридных молекулах?
- Как изменяется укладка мембранного белка в случае делеции фрагмента цепи? Соплассует ли уровень активности щелочной фосфатазы в случае модифицированных плазмид с изменением расположения белка?
- Находятся ли N- и С-концы полностью сформировавшейся молекулы мембранного белка (нормального, негибридного) на одной стороне мембраны?

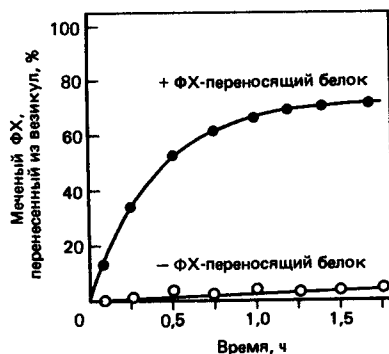


Рис. 8-16. Перенос меченого ФХ от донорных везикул к мембранам эритроцитов с помощью белка-переносчика ФХ.

8-29 Мембраны митохондрий и пероксисом в противоположность другим клеточным мембранам получают новые фосфолипиды в растворимой форме от белков-переносчиков фосфолипидов. Один из таких белков, ФХ-переносящий белок, специфически переносит фосфатидилхолин (ФХ) между мембранами. Для измерения активности этого белка смешивают «тени» эритроцитов (интактные плазматические мембраны без цитоплазмы) с искусственным фосфолипидными везикулами, содержащими радиоактивно меченый ФХ в обоих моно слоях мембраны везикулы. После инкубации при 37°C смесь быстро центрифугируют, так что тени оседают в дне пробирки, а везикулы остаются в супернатанте. Величина обмена рассчитывают путем измерения радиоактивности теней.

На рис. 8-16 представлены результаты такого эксперимента, где использовались меченые везикулы (доноры ФХ с наружным радиусом 10,5 нм и толщиной бислоя 4,0 нм. В отсутствие белков

переносчика никакого обмена не происходило, но в присутствии этого белка до 70% меченого ФХ из везикул переносилось в мембраны теней эритроцитов.

Для выяснения того, почему переносилось только 70% метки везикул-доноров, было поставлено несколько контрольных экспериментов.

1. Концентрация мембран теней эритроцитов в опыте была увеличена в пять раз, однако обмен по-прежнему остался на уровне 70%.
2. Свежевыделенный белок-переносчик был вновь добавлен через 1 ч, но это не привело к увеличению обмена.
3. Меченые липиды, остающиеся в везикулах-донорах, в конце реакции были проэкстрагированы и из них были получены свежие везикулы. И опять только 70% метки из этих везикул переходило в тени.

Если тени эритроцитов, помеченные в этих опытах, использовали в качестве мембран-доноров в обратном эксперименте (т.е. для переноса ФХ от мембран эритроцитов к синтетическим везикулам), то до 96% метки переходило в акцепторные везикулы.

- А. Какие возможные объяснения 70%-ного предела можно исключить на основании данных каждого из трех контрольных экспериментов?
- Б. Как вы думаете, чем объясняется 70%-ный предел?
- В. Как вы считаете, почему почти 100% метки может переноситься из мембран эритроцитов обратно в везикулы?

Аппарат Гольджи (МБК 8.7)

8-30 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. _____, локализованный обычно вблизи клеточного ядра, представляет собой набор уплощенных, ограниченных мембранами цистерн.
- Б. Стопка Гольджи имеет две разные стороны: _____, которая тесно связана с переходными элементами ЭР, и _____, которая переходит в трубчатый ретикулум, называемый *транс-сетью* Гольджи.
- В. Углеводные цепи, присоединенные к остаткам аспарагина в белках, называются _____.
- Г. К олигосахаридам с _____ в аппарате Гольджи не добавляются новые сахара, тогда как к _____ олигосахаридам в аппарате Гольджи добавляются в том или ином количестве другие сахара.
- Д. Присоединение сахаров к отдельным боковым цепям остатков серина или треонина называется _____.
- Е. Белки, экспортируемые из ЭР, входят в _____ компартмент аппарата Гольджи, затем перемещаются в его _____ компартмент и, наконец, в _____ компартмент.
- Ж. Из последнего компартмента Гольджи белки перемещаются в _____, представляющую собой трубчатый ретикулум, где белки разделяются и направляются по своим конечным «адресам».
- З. Хотя механизм переноса белков и липидов через аппарат Гольджи точно не известен, считается, что _____ отпочковываются от краев цистерн и переносят заключенные в них молекулы от цистерны к цистерне по всей стопке.

8-31 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие – нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Все сахара, имеющиеся в терминальной области сложных олигосахаридов, были присоединены к ним в *транс*-компарimente аппарата Гольджи с помощью набора гликозилтрансфераз, действующих в строго определенной последовательности.
- Б. Все гликопротеины и гликолипиды в составе внутриклеточных мембран ориентированы таким образом, что их олигосахаридные цепи обращены во внутренние полости клеточных органелл, тогда как в плазматической мембране их олигосахариды обращены к наружной поверхности клетки.
- В. N-связанные олигосахариды содействуют переносу белков через ЭР и аппарат Гольджи.
- Г. Белки сердцевинной области (кóра) протеогликанов превращаются в аппарате Гольджи в протеогликаны в результате присоединения к пептидной цепи за счет O-связывания (с серином или треонином) цепей гликозаминогликанов.
- Д. Начальные реакции расщепления многих полипептидных гормонов и нейропептидов катализируются протеазами, связанным с мембранами. Эти протеазы разрезают полипептидные цепи рядом с парами остатков основных аминокислот.
- Е. Экспортируемые белки движутся в одном направлении через *транс*-компаримент аппарата Гольджи и никогда не пропускают *проксимального* компаримента.

8-32 До недавнего времени существовали две конкурирующие модели движения веществ через аппарат Гольджи (рис. 8-17). Согласно модели образования цистерн, новые цистерны возникают непрерывно, отщипываясь, как везикулы, от места соединения с ЭР на *цис*-стороне аппарата Гольджи. Каждая вновь образованная цистерна движется по стопке (параллельно протекают процессы модификации содержащихся в ней веществ) и в конце концов разбивается на более мелкие, транспортные везикулы на другой стороне аппарата Гольджи. Согласно другой модели – модели везикулярного транспорта цистерны, раз возникнув, существуют постоянно, а созревающие гликопротеины движутся от цистерн на *цис*-стороне к цистернам на *транс*-стороне, будучи заключенным в мелкие транспортные везикулы.

Одна из проверок этих моделей основывалась на использовании мутантных клеток, дефектных по присоединению галактозы, которое должно происходить в *транс*-компарименте аппарата Гольджи. Мутантные клетки были инфицированы вирусом везикулярного стоматита (VSV) для получения удобного маркерного белка, а именно вирусного С-белка. В определенный момент инфекции добавляли ингибитор синтеза белка, чтобы остановить дальнейший синтез G-белка. Затем клетки инкубировали в течение короткого периода в присутствии радиоактивного предшественника N-ацетилглюкозамина, который в отсутствие синтеза белка присоединяется к полипептидной цепи исключительно в *проксимальном* компарименте Гольджи. После этого производили слияние инфицированных мутантных клеток с неинфицированными клетками дикого типа, в результате чего образовывалась общая цитоплазма, содержащая стопки аппаратов Гольджи обеих клеток. Спустя несколько минут клетки разрушали детергентом, а весь G-белок переводили в осадок путем добавления G-специфичных антител. После отделения от антител G-белки, несущие галактозу, осаждали лектином, который связывает галактозу.

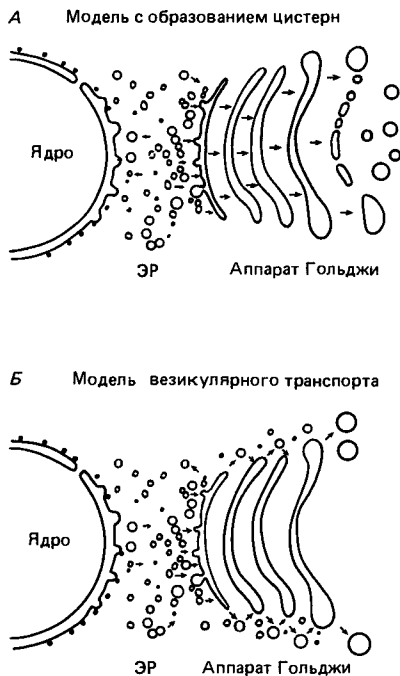


Рис. 8-17. Модель с образованием цистерн (А) и модель везикулярного транспорта (Б) для движения веществ через аппарат Гольджи (задача 8-32).

Измеряли радиоактивность в осадке и в супернатанте. Результаты этого эксперимента и контрольных опытов (проведенных только на мутантных клетках или только на клетках дикого типа) представлены в табл. 8-2.

Таблица 8-2. Добавление галактозы к G-белку после слияния клеток, инфицированных вирусом VSV, с неинфицированными клетками (задача 8-32)

	Осадок	Супернатант
1. Инфицированные мутантные клетки, слившиеся с неинфицированными клетками дикого типа	45%	55%
2. Инфицированные мутантные клетки, слившиеся с неинфицированными мутантными клетками	5%	95%
3. Инфицированные клетки дикого типа, слившиеся с неинфицированными клетками дикого типа	85%	15%

Радиоактивный G-белок был очищен и затем обработан лектином, специфически осаждающим белки, содержащие галактозу. В таблице приведены уровни радиоактивности осадка (G-белок с галактозой) и супернатанта (G-белок без галактозы) в процентах от общей радиоактивности.

- A. Между какими двумя компартментами аппарата Гольджи исследовалось движение белков в этом эксперименте? Объясните ваш ответ.
- B. Если бы белки продвигались по аппарату Гольджи за счет образования цистерн, то какие результаты можно было бы предсказать для описанного здесь эксперимента? Если бы белки проходили через аппарат Гольджи в транспортных везикулах, то каковы тогда были бы результаты?
- B. Какую из этих двух моделей подтверждают результаты опыта, представленные в табл. 8-2?
- 8-33** Вы получили несколько линий мутантных клеток, дефектных по способности присоединять углеводы к экспортируемым белкам. Используя белок, содержащий только N-связанные сложные олигосахариды и легко поддающийся очистке, вы проанализировали состав этих олигосахаридов в клетках разных мутантов. Оказалось, что все мутанты различаются по качественному и количественному составу олигосахаридов (табл. 8-3).
- A. Расположите мутанты в таком порядке, который соответствует этапам процессинга N-связанных олигосахаридов.
- B. Какие из мутантов дефектны по процессингу, проходящему в ЭР, а какие – по процессингу, проходящему в аппарате Гольджи?
- B. Какие из мутантов вероятнее всего дефектны по ферменту процессинга, непосредственно отвечающему за модификацию N-связанных олигосахаридов? Какие мутанты могут быть дефектными не по ферменту процессинга, а скорее по другому ферменту, затрагивающему процессинг олигосахаридов лишь косвенно?
- 8-34** G-белок вируса везикулярного стоматита (VSV) – это типичный мембранный гликопротеин. Кроме сигнального пептида, отщепляемого после попадания белка внутрь ЭР, в его составе есть также единственный сегмент, пронизывающий мембрану. С помощью него G-белок удерживается в плазматической мембране, так что

Таблица 8-3. Анализ сахаров, содержащихся в N-связанных олигосахаридах из клеток дикого типа и из клеток мутантных линий, дефектных по процессингу олигосахаридов (задача 8-33)

Клеточная линия	Man	GlnNAc	Gal	NANA	Glc
Дикий тип	3	4	2	2	0
Мутант А	3	4	0	0	0
Мутант В	5	3	0	0	0
Мутант С	9	2	0	0	3
Мутант D	9	2	0	0	0
Мутант E	5	2	0	0	0
Мутант F	3	3	0	0	0
Мутант G	8	2	0	0	0
Мутант H	9	2	0	0	2
Мутант I	3	4	2	0	0

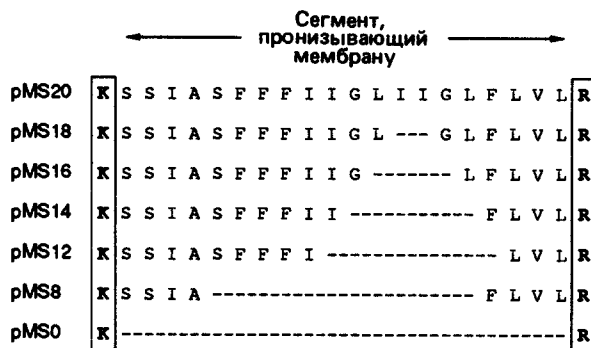
Сокращения: Man – манноза; GlnNAc – N-ацетилглюкозамин; Gal – галактоза; NANA – N-ацетилнейраминная кислота (сиаловая кислота); Glc – глюкоза. Цифрами указано число мономеров соответствующего сахара в данном олигосахариде.

его короткий С-концевой домен оказывается в цитоплазме, а гораздо более крупный, N-терминальный домен выступает с наружной стороны клетки. Трансмембранный сегмент состоит из 20 незаряженных и преимущественно гидрофобных аминокислотных остатков, к которым с обоих концов примыкают остатки основных аминокислот (рис. 8-18). Отрезка полипептидной цепи из двадцати аминокислот, образующих α -спираль, как раз достаточно для пересечения липидного бислоя толщиной 3 нм.

Чтобы проверить, какой длины должен быть сегмент, пронизывающий мембрану, вы модифицируете клонируемый ген G-белка, чтобы получить ряд мутантных белков, у которых этот сегмент короче (см. рис. 8-18). При введении модифицированных плазмид в культивируемые клетки каждый мутантный ген практически не отличался по уровню экспрессии от гена дикого типа. Вы анализируете распределение измененных G-белков внутри клеток несколькими способами.

1. Вы выясняете локализацию модифицированных G-белков в клетке с помощью метода иммуофлуоресцентной микроскопии, используя специфичные к G-белкам антитела с флуоресцентными маркерами.

Рис. 8-18. Пронизывающие мембрану домены G-белков из нормальных и мутантных вирусов VSV (задача 8-34). В номерах плазмид отражено число аминокислот в сегментах, пронизывающих мембрану; например, pMS20 означает: дикий тип, в сегменте содержится 20 аминокислот. Штриховыми линиями обозначены аминокислоты, отсутствующие в результате мутаций. Буквы в прямоугольниках обозначают основные аминокислоты на концах сегментов, пронизывающих мембрану.



2. Вы характеризуете присоединенные цепочки олигосахаридов, воздействуя на G-белки эндогликозидазой Н (эндо-Н), которая отщепляет только те N-связанные олигосахариды, которые не достигли определенной стадии процессинга в аппарате Гольджи (см. МБК, рис. 8-63).
3. Вы определяете, сохраняется ли короткий С-концевой цитоплазматический домен (который характерен для нормального белка) в измененных G-белках, для чего обрабатываете выделенные микросомы протеазой. У нормального G-белка этот домен при обработке отщепляется.

Результаты этих экспериментов суммированы в табл. 8-4.

Таблица 8-4. Результаты опытов, характеризующих распределение G-белков в нормальных и мутантных клетках (задача 8-34)

Плазмиды	Локализация в клетке	Обработка эндо-Н	Обработка протеазой
pMS20	Плазматическая мембрана	Устойчив	Чувствителен
pMS18	—»—	—»—	—»—
pMS16	—»—	—»—	—»—
pMS14	—»—	—»—	—»—
pMS12	Внутри клетки	+/- Устойчив	—»—
pMS8	Внутри клетки	Чувствителен	—»—
pMS0	Внутри клетки	Чувствителен	Устойчив

Примечания: Символ +/- в колонке «Обработка эндо-Н» означает, что только 30% G-белка было чувствительно к ферменту эндо-Н; другие модифицированные G-белки были либо полностью устойчивы, либо полностью чувствительны. В колонке «Обработка протеазой» термин «Чувствителен» означает, что короткий С-концевой домен удаляется при обработке ферментом. Термин «Устойчив» указывает, что мол. масса G-белка не изменялась при обработке.

- А. Насколько позволяют эти данные, определите внутриклеточную локализацию каждого измененного G-белка, который не может достичь плазматической мембраны.
- Б. Какова минимальная длина пронизывающего мембрану сегмента у G-белка VSV, достаточная для закрепления белка в мембране?
- В. Какова минимальная длина пронизывающего мембрану сегмента, необходимая для правильной сортировки G-белка?

Транспорт белков из аппарата Гольджи в лизосомы (МБК 8.8)

8-35 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. _____ — это ограниченный мембраной мешок с гидролитическими ферментами, предназначенными для регулируемого внутриклеточного расщепления макромолекул.
- Б. Гидролитические ферменты, активные при низком pH, называются _____.
- В. Компартмент, в который поступают новосинтезированные лизосомные гидролазы и мембранные белки из аппарата Гольджи, называется _____.
- Г. Деградация обработанных частей клетки может происходить путем _____, при которой мембраны, происходящие из ЭР,

замыкаются с образованием особой органеллы, _____, сливающейся затем с лизосомой.

- Д. Клетки, специализированные для фагоцитоза, могут поглощать микроорганизмы, образуя _____, которые после слияния с лизосомой превращаются в _____.
- Е. Наиболее серьезная из болезней, связанных с нарушением локализации лизосомных ферментов, — это очень редкое заболевание, называемое _____, при которой гидролазы полностью находятся вне лизосом.

8-36 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. В лизосомной мембране действует протонная помпа, использующая энергию гидролиза АТФ для того, чтобы выкачивать из лизосомы протоны и тем самым поддерживать в ее полости низкий pH.
- Б. Лизосомы — это разнообразные по форме и размерам органеллы присутствующие во всех эукариотических клетках, т. е. в клетках обладающих ядром.
- В. Эндолизосомы превращаются в зрелые лизосомы в результате утраты компонентов эндосомной мембраны и дальнейшего снижения внутреннего pH.
- Г. Материал, поглощенный путем эндоцитоза, сразу попадает в лизосомы, где его компоненты могут разрушаться до небольших молекул.
- Д. Лизосомные гидролазы маркируются для направления в лизосомы группами маннозо-6-фосфата (М6Ф), которые присоединяются к их N-связанным олигосахаридам в полости аппарата Гольджи.
- Е. Если обработать клетки таким слабым основанием, как аммоний или хлороквин, которые повышают pH внутри органелл до нейтрального, то рецепторы М6Ф будут накапливаться в аппарате Гольджи, так как они не могут в таких условиях связываться с лизосомными ферментами.
- Ж. Поскольку все молекулы гликопротеинов, которые попадают в аппарат Гольджи, содержат одинаковые N-связанные олигосахариды, то сигнал для присоединения единиц М6Ф к олигосахаридам должен быть на каком-то участке полипептидной цепи каждой гидролазы.
- З. Сигнал узнавания на лизосомных гидролазах представляет собой по-видимому, сигнальный участок специфической конформации а не сигнальный пептид, судя по тому, что узнавание фактически прекращается при частичной денатурации гидролазы.
- И. При I-клеточной болезни лизосомы в клетках некоторых типов содержат нормальный набор лизосомных ферментов, что указывает на существование второго пути сортировки гидролаз в лизосомы, который действует лишь в некоторых, но не во всех клетках.

8-37 Больные с синдромом Гюнтера или синдромом Хёрлера редко доживают до 20 лет. Анализ показывает, что в их лизосомах накапливаются гликозаминогликаны вследствие утраты специфических лизосомных ферментов, необходимых для их деградации. Если вызывали слияние клеток от больных с одним синдромом с клетками от больных с другим синдромом, то в лизосомах гибридных клеток гликозаминогликаны деградировали нормальным образом, следовательно, у разных больных были утрачены разные ферменты деградации. Даже если такие клетки просто культивировали вместе, они исправляли дефекты друг друга.

Самое удивительное то, что и среда от культуры клеток Хёрлера исправляла дефекты в клетках Гюнтера (и наоборот). Присутствующие в среде корректирующие факторы инактивировались протеазами, а также при обработке периодатом, разрушающим углеводы, или щелочной фосфатазой, отщепляющей фосфатную группу от сложных молекул.

- А. Как вы думаете, что представляют собой корректирующие факторы и как они исправляют лизосомные дефекты?
- Б. Как вы считаете, почему в результате обработки протеазой, периодатом или щелочной фосфатазой корректирующие факторы инактивируются?
- В. Будет ли подобная коррекция наблюдаться в случае мутаций по цитозольным ферментам или при их утрате?

8-38 Дети с I-клеточной болезнью синтезируют совершенно нормальные лизосомные ферменты, но последние секретируются из клеток вместо того, чтобы направляться в лизосомы. Ошибка происходит из-за того, что в клетках нет N-ацетилглюкозаминфосфат-трансферазы, участвующей в образовании маннозофосфатного маркера, необходимого для правильной сортировки. В принципе I-клеточная болезнь может быть также вызвана нехваткой и двух других белков: фосфогликозидазы, отщепляющей N-ацетилглюкозамин и «открывающей» тем самым M6Ф, и самого маннозофосфатного рецептора.

Эти три потенциальных разновидности I-клеточной болезни можно было бы различить по способности культуральной среды от разных клеток исправлять дефекты в мутантных клетках. Представьте себе, что у вас есть клеточные линии от трех гипотетических I-клеточных больных (А, В и С), для которых получены следующие результаты:

1. Культуральная среда от нормальных клеток исправляет дефекты в клетках В и С, но не в клетках А.
2. Культуральная среда от клеток А исправляет дефект клеток Хёрлера, а культуральная среда от клеток В и С – нет.
3. Если культуральную среду от мутантных клеток сначала обработать фосфогликозидазой, отщепляющей N-ацетилглюкозамин, то после этого культуральная среда от клеток А или С будет исправлять дефекты клеток Хёрлера, а культуральная среда от клеток В – нет.

На основе этих результатов сделайте вывод о природе дефекта в каждой из линий мутантных клеток.

Транспорт из аппарата Гольджи в секреторные везикулы и к поверхности клетки (МБК 8.9)

8-39 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Всем клеткам свойственна _____ секреция, а специализированные секреторные клетки обладают еще способностью к _____ секреции, при которой растворимые белки и другие вещества накапливаются в секреторных везикулах для последующего высвобождения.
- Б. В клетках, осуществляющих секрецию в ответ на внеклеточный сигнал, секретируемые белки концентрируются и хранятся в _____, откуда они высвобождаются путем экзоцитоза в ответ на сигнал.
- В. В типичной эпителиальной клетке имеются две непосредственно

переходящих одна в другую, но различающихся по составу части плазматической мембраны: _____ часть, граничащая с полостью протока, и _____, покрывающая остальную часть клетки.

Г. Вирус леса Семлики – это типичный вирус, имеющий оболочку; он состоит из РНК-генома, который окружен белковым чехлом, называемым _____ и покрытым в свою очередь дополнительным, липидным бислоем, содержащим три разных белка, называемых _____.

- 8-40 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие – нет. Если утверждение неверно, объясните почему.
- А. Секреторные везикулы отпочковываются от *транс*-компартамента аппарата Гольджи.
 - Б. После слияния секреторной везикулы с плазматической мембраной специализированные белки мембраны секреторной везикулы быстро удаляются из плазматической мембраны путем эндоцитоза и возвращаются в аппарат Гольджи для повторного использования.
 - В. В секреторной клетке для каждого из трех типов белков, покидающих *транс*-сеть Гольджи, требуются специальные сигналы: для сортировки в лизосомы, для направления в секреторные везикулы и для немедленного выхода на поверхность клетки.
 - Г. Поскольку поляризованные клетки секретируют один набор белков через апикальный участок, а другой – через базолатеральный участок, эти два набора белков должны быть снабжены разными сортирующими сигналами, благодаря которым их потоки направляются к соответствующим участкам клеточной поверхности.
 - Д. Вирусы, имеющие оболочку и проникающие в клетки путем эндоцитоза, избегают попадания в эндосомы благодаря тому, что белок оболочки вызывает слияние последней с мембраной эндосомы, в результате чего нуклеокапсид высвобождается в цитозоль.
 - Е. Имеющие оболочку вирусы, которые приобретают ее, отпочковываясь от внутриклеточных мембран, выходят наружу, двигаясь из ЭР и полости аппарата Гольджи к клеточной поверхности так, как если бы они были белками, предназначенными для секреции.

8-41 Клетки печени секретируют в кровь конститутивным путем большой набор белков. Вас интересует, сколько нужно времени для секреции того или иного белка. Чтобы выяснить это, вы добавляете ³⁵S-метионин к культивируемым клеткам печени, чтобы белки метилились в процессе синтеза и затем отбираете пробы культуральной среды в разные моменты времени, чтобы уловить появление в среде отдельных меченых белков. Как показано на рис. 8-19, альбумин появляется через 20 мин, трансферрин – через 50 мин, а белок, связывающий ретинол, – через 90 мин. Вы удивлены различиями в скоростях секреции, которые не коррелируют явным образом с размером, функцией или имеющимся количеством этих белков.

Почему секреция трансферрина и белка, связывающего ретинол, занимает так много времени по сравнению с секрецией альбумина? Вы предполагаете, что медленный этап в конститутивной секреции этих белков протекает либо в ЭР, либо в аппарате Гольджи. Чтобы определить, где именно, вы метите клетки в течение 4 ч – период, достаточный для того, чтобы распределение меченых белков не отличалось от нормального стационарного распределения, характерного для немеченых белков. (В стационар

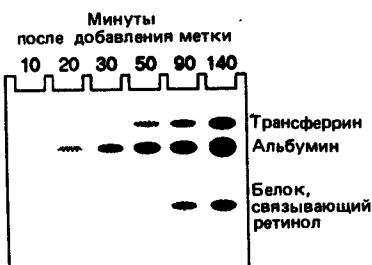


Рис. 8-19. Время появления секретируемых белков в среде (задача 8-41). В разные моменты времени после мечения белки были подвергнуты иммунопреципитации специфичными антителами, разделены с помощью гель-электрофореза и проявлены методом радиоавтографии.



Рис. 8-20. мина и т образую Гольджи альбумин ли с пом преципит радиавт

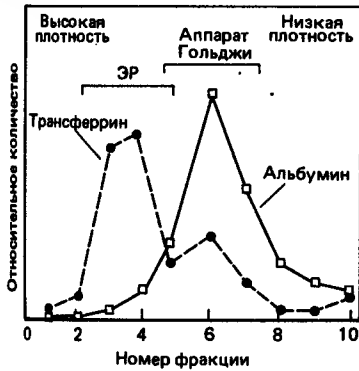


Рис. 8-20. Распределение альбумина и трансферрина в везикулах, образующихся из ЭР и аппарата Гольджи (задача 8-41). Меченый альбумин и трансферрин определяли с помощью методов иммунопреципитации, электрофореза и радиоавтографии.

ном состоянии приток белков на каждом этапе секреции точно равняется их оттоку.) Затем вы гомогенизируете клетки, чтобы разбить ЭР и аппарат Гольджи на отдельные везикулы, и разделяете последние путем центрифугирования в градиенте плотности сахарозы, после чего измеряете количество меченых альбумина и трансферрина в каждом из двух типов везикул (рис. 8-20).

Где протекает медленная стадия конститутивной секреции трансферрина, в ЭР или в аппарате Гольджи, и где — медленная стадия конститутивной секреции альбумина? Каким образом описанные здесь опыты позволяют вам определить это?

- 8-42 Поляризованные эпителиальные клетки должны производить дополнительные операции по сортировке белков, так как их плазматические мембраны разделяются на апикальную и базолатеральную области, несущие разные наборы белков. Белки, предназначенные для этих двух участков, по-видимому, мигрируют по направлению к ним прямо из аппарата Гольджи. Один путь сортировки белков по этим областям мембраны мог бы состоять в использовании для одного класса белков специфического сортирующего сигнала, который бы активно узнавался и направлял белки к одной из областей плазматической мембраны. Белки второго класса могли бы двигаться к другой области мембраны по пути, не требующему сигнала (в соответствии с остаточным принципом).

Чтобы выяснить детали этого последнего пути, рассмотрим следующий эксперимент. Клонированные гены для нескольких чужеродных белков были встроены в поляризованные клетки при помощи техники рекомбинантной ДНК, чтобы они экспрессировались в этих клетках. (Клетки других типов выделяли данные белки, но поляризованные клетки их не экспрессировали.) После включения этих генов в поляризованные клетки определяли, в каких участках мембраны они выделяются. Оказалось, что хотя клетки и оставались поляризованными, чужеродные белки выделялись из них практически в одинаковых количествах в апикальных и базолатеральных областях мембраны.

- А. Какой результат должен был бы получиться в эксперименте, если исходить из предположения, что направление к одной области плазматической мембраны происходит за счет активного сигнала, а к другой — по остаточному принципу?
- Б. Подтверждают ли эти результаты концепцию остаточного пути, изложенную выше?

Везикулярный транспорт и сохранение индивидуальности компартментов (МБК 8.10)

- 8-43 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Везикулы, покрытые _____, осуществляют опосредуемый рецептором эндоцитозный транспорт от плазматической мембраны к эндосомам, а также опосредуемый рецептором транспорт из *транс*-сети Гольджи к эндолизосомам.
- Б. Везикулы, _____, переносят заключенный в них материал из ЭР в аппарат Гольджи, от *цис*-компартмента к *промежуточному* компартменту и далее — к *транс*-компартменту этой органеллы.

- 8-44 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Чтобы внутриклеточная сортировка была специфической, каждая транспортная везикула должна нести на своей поверхности метку своего рода «молекулярный адрес», чтобы доставлять свое содержимое к определенным клеточным мембранам.
- Б. Если прямое движение от ЭР к плазматической мембране происходит автоматически, то постоянно присутствующие в ЭР и аппарате Гольджи макромолекулы должны иметь сигнальные участки, благодаря которым они селективно задерживаются внутри этих органелл.

8-45 Везикулярный транспорт по конститутивному пути между стопками Гольджи и наружу, к плазматической мембране, осуществляется, по-видимому, в везикулах, не покрытых клатрином. Особенность такого вида транспорта, называемого объемным, заключается в том, что содержимое аппарата Гольджи не концентрируется в везикулах. Зная, что транспорт в везикулах, покрытых клатрином, связан со значительным концентрированием веществ, вы сомневаетесь в том, что при объемной конститутивной секреции не происходит концентрирования.

Чтобы выяснить, концентрируются ли вещества в везикулах при конститутивном пути, вы заражаете клетки вирусом везикулярного стоматита (VSV) и следите за появлением вирусного G-белка. Ваша смелая идея заключается в том, чтобы сравнить концентрацию G-белка в полости стопок Гольджи с его концентрацией в транспортных везикулах, не покрытых клатрином. Вы хотите измерить концентрацию G-белка, приготовив тонкие срезы клеток, инфицированных вирусом VSV, и проинкубировав их со специфическими антителами к G-белку, мечеными частицами золота. Частички золота видны на электронных фотографиях как маленькие черные пятнышки, поэтому довольно просто подсчитать их в полости транспортных везикул (как полностью сформированных, так и отпочковывающихся) и в аппарате Гольджи. Вы определяете концентрацию G-белка двумя способами 1) по числу частиц золота на поперечном срезе и 2) по числу частиц золота на линейном участке мембраны. Эти результаты представлены в табл. 8-5.

Концентрируется ли содержимое везикул, участвующих в объемном транспорте, или нет?

Таблица 8-5. Сравнительный анализ содержания G-белка в просветах и мембранах аппарата Гольджи и везикул (задача 8-45)

Измеряемый параметр	Среднее содержание
Плотность на срезе через аппарат Гольджи в <i>неинфицированных</i> клетках	5/мкм ²
Плотность на срезе через аппарат Гольджи в <i>инфицированных</i> клетках	271/мкм ²
Плотность на срезе через отпочковывающиеся и зрелые везикулы Гольджи в <i>инфицированных</i> клетках	233/мкм ²
Плотность по длине мембран цистерн Гольджи в <i>инфицированных</i> клетках	6/мкм
Плотность по длине мембран и везикул Гольджи в <i>инфицированных</i> клетках	4/мкм

ДНК и белки, входящие в состав хромосом (МБК 9.1)

9-1 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Каждая молекула ДНК упакована в _____, а вся генетическая информация, хранящаяся в хромосомах организма, составляет его _____.
- Б. Для функционирования хромосом необходимы три элемента последовательности ДНК: по крайней мере одна _____ для того, чтобы могло осуществляться копирование хромосом, одна _____ для обеспечения последующего разделения двух копий при митозе и две _____ для поддержания целостности хромосомы в период между делениями клеток.
- В. В спирали ДНК каждая область, где синтезируется функциональная молекула РНК, представляет собой _____.
- Г. В генах высших эукариот короткие сегменты кодирующей ДНК, которые называются _____, обычно разделены длинными последовательностями некодирующей ДНК, которые называются _____.
- Д. В многоклеточном организме клетки каждого типа содержат свой особый набор _____, которые, действуя в разных сочетаниях, способствуют экспрессии разных генов.
- Е. Молекулы белков, связанные с молекулой ДНК, тормозят ее движение при гель-электрофорезе, что позволяет с помощью чувствительного метода, называемого _____, выявлять сайт-специфические ДНК-связывающие белки.
- Ж. Некоторые ДНК-связывающие белки содержат один или более доменов, известных под названием _____; в их состав входит около 30 аминокислот, образующих одну структурную единицу вокруг атома Zn, который связан с двумя остатками цистеина и двумя остатками гистидина.
- З. Некоторые бактериальные сайт-специфические ДНК-связывающие белки содержат последовательность из 20 аминокислотных остатков, образующих структуру из двух α -спиралей, разделенных коротким витком; ее называют структурой _____.
- И. Связывание, при котором два белка помогают один другому прочнее связаться с ДНК, называется _____.
- К. Наиболее стабильная структура ДНК — это так называемая _____ ДНК, однако необычные последовательности нуклеотидов могут образовывать другие типы спиралей: правозакрученную _____ ДНК и левозакрученную _____ ДНК.
- Л. В структуре эукариотических хромосом преобладают нуклеопротеиновые частицы _____, которые играют большую роль в упаковке и организации всей ДНК в клеточном ядре.

- М. Комплекс ядерной ДНК эукариотических клеток со структурными белками — _____ и _____, содержащимися в больших количествах, называют _____.
- Н. Пять типов гистонов можно разделить на две основные группы _____ гистоны и гистоны _____.
- О. Области ДНК, в которых нет нуклеосом, легко разрушаются под действием следовых количеств дезоксирибонуклеазы; эти участки называют _____.
- П. В живых клетках нуклеосомы располагаются тесно одна за другой образуя нить _____, в котором ДНК сконденсирована сильнее, чем в расправленной структуре, называемой «бусины на нитке».

9-2 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. В каждой хромосоме содержится одна длинная молекула ДНК.
- Б. Теломера обеспечивает точность репликации хромосомы, так что не происходит утраты ни одного нуклеотида на конце хромосомы тем самым решается проблема репликации концов.
- В. На основе данных о частоте мутаций популяционные биологи сделали вывод, что с регуляцией и кодированием жизненно важных белков связана лишь небольшая часть (несколько процентов) генома млекопитающих.
- Г. В генах высших эукариот интроны обычно превосходят экзоны по размеру и по количеству.
- Д. Из сравнения ДНК относительно близких организмов, например человека и мыши, можно заключить, что консервативные последовательности представляют собой важные в функциональном отношении экзоны и регуляторные области, а неконсервативные последовательности — это некодирующая ДНК.
- Е. Узнавание каждой из четырех возможных нуклеотидных пар (А—Т, Т—А, Г—С, С—Г) происходит благодаря специфическому расположению «крайних» атомов, которые выступают в большую бороздку спирали ДНК.
- Ж. Радиоактивно меченные фрагменты ДНК можно использовать при выявлении сайт-специфических ДНК-связывающих белков методом торможения в геле, при очистке белков методом аффинной хроматографии ДНК и при отборе бактерий, экспрессирующих определенный белок.
- З. Структура, называемая «цинковым пальцем», присутствует только в эукариотических сайт-специфических ДНК-связывающих белках, а структура спираль-виток-спираль обнаруживается только в белках бактериального происхождения.
- И. Если ДНК-связывающий белок образует симметричный димер, то узнаваемая им последовательность скорее всего также обладает симметрией.
- К. Если два сайт-специфических ДНК-связывающих белка взаимодействуют с частично перекрывающимися последовательностями ДНК, то связывание каждого из них стимулируется присутствием другого; такое связывание называют кооперативным.
- Л. В В-форме ДНК сдвиг оснований относительно друг друга, как и угол поворота спирали между парами оснований, зависит от того, какие нуклеотиды в последовательности соседствуют друг с другом.
- М. Для того чтобы ДНК свернулась в тугую спираль внутри клетки необходимо, чтобы в ней присутствовали особые последовательности.

Обработка
денатурации
и ренатурации

21,0

13,4

10,5

6,7

3,8

Рис. 9-1. Рибосомная ДНК *Tetrahymena* против полиминихром в Т. п. н.

ности, например AAAAAANNNNN, повторяющиеся через каждые 10–11 нуклеотидов.

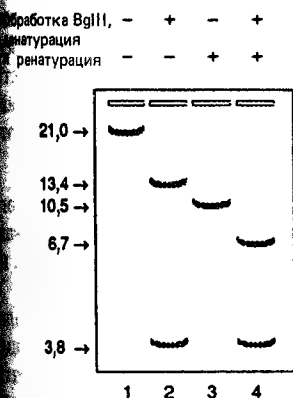
- Н. Гистоны — это белки относительно небольшого размера, несущие много положительно заряженных аминокислот. Положительный заряд способствует тому, что гистоны тесно связываются с ДНК независимо от ее нуклеотидного состава.
- О. Нуклеосома состоит примерно из 146 нуклеотидных пар, уложенных двумя витками вокруг гистонового октамера, представляющего собой комплекс из восьми нуклеосомных гистонов.
- П. Для большинства нуклеосом, по-видимому, не характерно фиксированное положение в ДНК, однако известны поразительные примеры точно определенного расположения нуклеосом.
- Р. Сайты, сверхчувствительные к нуклеазе, локализованы в линкерной ДНК между нуклеосомами.
- С. Причиной локальной деконденсации хроматина вокруг активных генов может быть разрушение белками-регуляторами взаимодействия между молекулами гистона H1.
- Т. Обычно на электронных фотографиях расплавленного (спредированного) хроматина «бусины» нуклеосом в транскрибируемых и нетранскрибируемых областях ДНК выглядят по-разному.

9-3 *Tetrahymena* — это ресничная инфузория, в клетке которой присутствуют два ядра. Ядро меньшего размера (микронуклеус) содержит основную копию хромосом клетки. Микронуклеус участвует в половой конъюгации, но не в постоянной экспрессии генов. Ядро большего размера (макронуклеус) содержит «рабочую» копию клеточного генома в виде большого числа двухцепочечных фрагментов ДНК размером в один ген (мини-хромосомы), которые активно транскрибируются. Мини-хромосомы, содержащие гены рибосомной РНК, представлены большим числом копий, их можно отделить от остальных мини-хромосом путем центрифугирования в градиенте плотности и подробно изучить.

По данным электронной микроскопии каждая рибосомная мини-хромосома представляет собой линейную молекулу размером 21 т. п. н. При гель-электрофорезе рибосомные мини-хромосомы также мигрируют как молекулы размером 21 т. п. н. (рис. 9-1, дорожка 1). Однако если мини-хромосома разрезается рестриктазой BglII, то размеры двух получающихся фрагментов (13,4 и 3,8 т. п. н.) в сумме меньше 21 т. п. н. (дорожка 2). Если обработать ДНК другими рестриктазами, то размеры фрагментов в сумме всегда будут меньше 21 т. п. н. Более того, суммы величин фрагментов, полученных при обработке разными нуклеазами, различны.

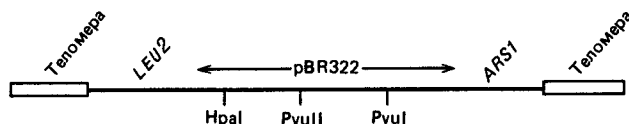
Если неразрезанную мини-хромосому до нанесения на гель денатурировать и затем ренатурировать, то фрагмент размером 21 т. п. н. заменяется на двухцепочечный фрагмент, длина которого точно равна половине исходной молекулы — 10,5 т. п. н. (дорожка 3). Сходным образом после обработки BglII, денатурации и ренатурации фрагмент размером 13,4 т. п. н. заменяется фрагментом вдвое меньшего размера — 6,7 т. п. н. (дорожка 4).

Объясните, почему сумма размеров фрагментов, полученных при рестрикции, не равна 21 т. п. н. и почему подвижность полос меняется при денатурации и ренатурации ДНК. Какова может быть, по вашему мнению, общая организация последовательностей в рибосомной мини-хромосоме?



9-1. Рестрикционный анализ рибосомной мини-хромосомы из *Tetrahymena* (задача 9-3). Числа указывают размеры мини-хромосомы и фрагментов в т. п. н.

Рис. 9-2. Строение искусственной линейной хромосомы, в которой между теломерами *Tetrahymena* заключены последовательности дрожжевой и бактериальной ДНК (задача 9-4). Указаны единичные сайты разрезания тремя рестриктазами.



9-4 Вы придумали хитроумный способ создания мини-хромосом у дрожжей. Вам известно, что при расщеплении рибосомных генов *Tetrahymena* рестриктазой *Bam*HI образуется фрагмент размером 1,5 т. п. н., содержащий теломеру. Вы хотите соединить такие фрагменты с каждым из концов линейаризованной дрожжевой плазмиды и надеетесь, что после этого плаزمиды будут существовать как линейная молекула — мини-хромосома.

В качестве плазмидной ДНК вы используете кольцевую плазмиду дрожжей, содержащую точку начала репликации дрожжей (*ARS1*), маркерный ген *LEU2*, по которому можно провести отбор на основе роста дрожжевых клеток, и последовательности бактериальной плазмиды *pBR322* (рис. 9-2). Вы линейаризуете плазмиду размером 9 т. п. н. с помощью рестриктазы *Bgl*II, которая разрезает эту плазмиду только в одном месте. Затем вы инкубируете линейную плазмиду с фрагментами размером 1,5 т. п. н., несущим теломеру *Tetrahymena*, в присутствии ДНК-лигазы и двух рестриктаз — *Bgl*II и *Bam*HI. При анализе продуктов лигирования вы обнаруживаете (кроме исходных компонентов) молекулы размером 10,5 и 12 т. п. н. Вы выделяете фрагмент размером 12 т. п. н. и вводите его путем трансформации в дрожжи, после чего проводите отбор на клетки, экспрессирующие маркерный ген в составе плазмиды.

Чтобы определить, какая это плазмиды, линейная или кольцевая, вы выделяете из трансформантов общую ДНК, обрабатываете препараты рестриктазами *Hpa*I, *Pvu*II и *Pvu*I, разделяете фрагменты в геле и проводите их блот-гибридизацию с радиоактивной ДНК *pBR322*. Схема радиоавтографа представлена на рис. 9-3.

- Как по результатам анализа, представленным на рис. 9-3, различить линейную и кольцевую формы плазмиды в трансформированных дрожжах?
- Объясните, почему лигирование фрагментов ДНК в присутствии рестриктаз *Bam*HI и *Bgl*II обеспечивает получение преимущественно мини-хромосомы нужной конструкции. Последовательность, узнаваемая *Bgl*II, — это —A*GATCT—, где знаком * отмечен сайт разрезания; последовательность, узнаваемая *Bam*HI, — это —G*GATCC—.

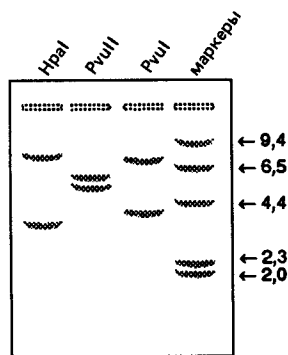


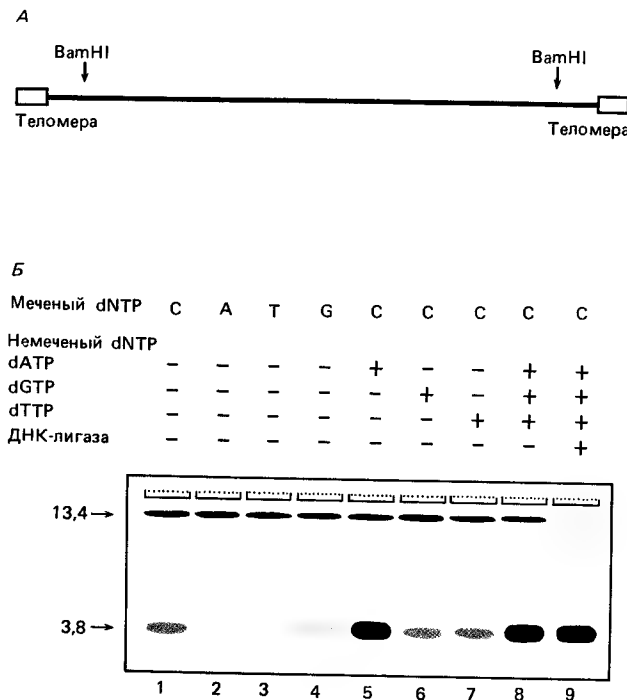
Рис. 9-3. Радиоавтограф рестриктазов плазмидной ДНК (задача 9-4). Маркерные ДНК, размер фрагментов которых известен, приведены справа (в т. п. н.).

9-5 Точная структура теломер полностью не определена ни для одного организма. Наиболее подробно изучены теломеры, локализованные на концах рибосомных мини-хромосом. Для расшифровки структуры большое значение имеют следующие наблюдения.

- Если рибосомные мини-хромосомы инкубировать с ДНК-полимеразой в присутствии ^{32}P -dCTP и трех других немеченных dNTP (дезоксинуклеозидтрифосфатов), то концевые фрагменты длиной 3,8 т. п. н., полученные при обработке рестриктазой *Bam*HI, метятся гораздо сильнее, чем центральный фрагмент, содержащий 13,4 т. п. н. (рис. 9-4, дорожка 8). При инкубации с одним из dNTP включение наблюдается лишь при использовании ^{32}P -dCTP (сравните дорожку 1 с дорожками 2–4). Включение dCTP в присутствии dATP было значительно более высоким, чем включение при инкубации только с dCTP (сравните дорожку 5 и дорожку 1). Включение dCTP в присутствии dCTP

Рис. 9-4. С мини-хромосом радиоактивно меченной ДНК-полимеразой. Рибосомные мини-хромосомы инкубировали с различными концами, как указано. *Bam*HI. При разделении на автографе

Рис. 9-4. Строение рибосомной мини-хромосомы (А) и включение радиоактивно меченных нуклеотидов ДНК-полимеразой (Б) (задача 9-5). Рибосомные мини-хромосомы инкубировали в присутствии различных комбинаций нуклеотидов, как указано, и затем обрабатывали BamHI. Полученные фрагменты разделяли с помощью гель-электрофореза и выявляли методом радиоавтографии.



или dTTP не превышало включение в том варианте, где присутствовал только dCTP (дорожки 6 и 7).

- Предварительная инкубация мини-хромосомы с ДНК-лигазой практически не влияет на включение в концевые фрагменты, но приводит к снижению в десять раз включения в центральный фрагмент (дорожка 9).
 - В присутствии трех других немеченых dNTP ^{32}P -dCTP включается в тандемно повторяющуюся последовательность 5'-CCCCAA-3'.
 - Мини-хромосомы, меченные только ^{32}P -dCTP, при денатурации образуют одноцепочечные фрагменты, состоящие из 2, 3 или 4 тандемно повторенных последовательностей CCCCCA.
 - Если свободные 5'-фосфаты (не образующие фосфодиэфирной связи) в мини-хромосомах замещают мечеными фосфатами, а затем обрабатывают так, чтобы все связи с пуриновыми нуклеотидами разрушились, то основным меченым фрагментом становится CCC.
 - Если мини-хромосому разрезать рестриктазой AluI, которая расщепляет ее в участках, расположенных очень близко к концам мини-хромосомы, то при электрофорезе образуется очень растянутая полоса, содержащая концевой фрагмент. Ведущий край этой полосы соответствует длине фрагментов около 360 п.н., а край, движущийся медленнее, - фрагментам длиной примерно 520 п.н.
 - Синтез ДНК, начинающийся внутри тандемных повторов CCCCCA, перемещается постепенно в направлении центра мини-хромосомы.
- А. Является ли число повторов CCCCCA, входящих в состав теломеры, фиксированным или оно меняется? Дайте минимальную и максимальную оценку числа повторов и объясните ход ваших рассуждений.
- Б. На каком конце каждой из цепей мини-хромосомы находятся

- повторы, на 5'- или на 3'-конце? Объясните, как вы это определили.
- В. Характер включения метки при синтезе ДНК или при замещении 5'-фосфатов указывает на то, что не все нуклеотиды в повторе ССССAA связаны между собой фосфодиэфирными связями. Что можно сказать о природе одноцепочечных интервалов в повторах ССССAA на основе различных наблюдений?
- Г. Каково расстояние между одноцепочечными интервалами в повторах ССССAA?
- Д. На основе этих данных изобразите как можно более подробную структуру теломер рибосомной мини-хромосомы *Tetrahymena* (Обратите внимание на то, что последовательность на конце хромосомы в этих экспериментах не определяли, а выявляли только структуру повторов ССССAA, из которых состоит теломера.)

- 9-6 Очень удобным графическим методом для сравнения нуклеотидных последовательностей служит так называемая точечная матрица. Пример использования этого метода приведен на рис. 9-5, где ген β -глобина человека сравнивается с кДНК β -глобина человека (рис. 9-5, А) и с геном β -глобина мыши (рис. 9-5, Б). Эти матрицы получают путем сопоставления блоков последовательностей и в данном случае блоков из 11 нуклеотидов. Если совпадает 9 или более нуклеотидов, на диаграмме ставится точка в месте пересечения координат, соответствующих сравниваемым блокам. При сравнении всех возможных блоков получается картина, подобная представленной на рис. 9-5, где гомологичные последовательности выявляются как диагональные линии.
- А. На основе сравнения гена β -глобина человека и кДНК β -глобина человека (рис. 9-5, А) определите положение экзонов и интронов в гене β -глобина.
- Б. Все ли экзоны гена β -глобина человека гомологичны экзонам гена β -глобина мыши (рис. 9-5, Б)? Выявите и поясните все различия.
- В. Существует ли гомология между генами β -глобинов мыши и человека помимо той, что относится к экзонам? Если да, то определите положение гомологичного участка и объясните, как он мог сохраниться в ходе эволюции.
- Г. Подвергалась ли длина интронов в каждом из этих генов изменениям при дивергенции в ходе эволюции? Как можно это определить?

Рис. 9-5. Точечная матрица, позволяющая сравнить ген β -глобина человека с кДНК для β -глобина человека (А) и с геном β -глобина мыши (Б) (задача 9-6). Указаны 5'- и 3'-концы этих последовательностей. На обеих матрицах последовательность гена человека одна и та же, кДНК человека (А) короче, чем ген мыши (Б), поэтому диагональные линии на двух матрицах имеют разные наклоны.

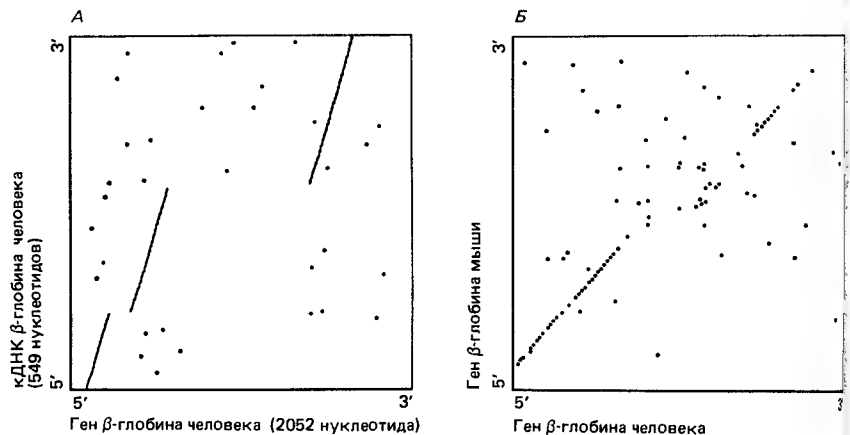
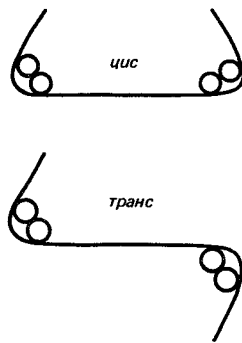


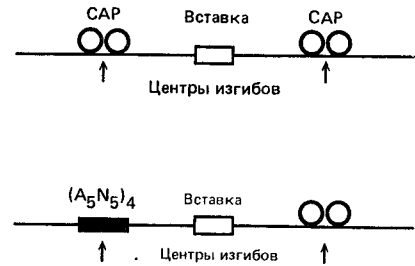
Рис. 9-6
зываются
и транскрип-
тов. Б. Мые дл
при свя
между н
ностью
разделя
в конс
и (A₅N

Рис. 9-6. Изгибание ДНК при связывании с CAP (задача 9-7). А. Цис- и транс-конфигурация пары изгибов. Б. Две конструкции, используемые для изучения изгибания ДНК при связывании с CAP. Зависимость между относительной подвижностью и числом нуклеотидов, разделяющих участки связывания, в конструкциях CAP CAP (В) и $(A_5N_5)_4$ -CAP (Г).

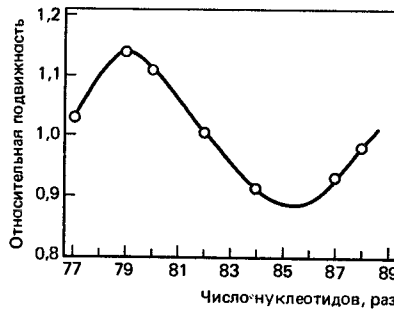
А. ДНК, ИЗОГНУТАЯ В РЕЗУЛЬТАТЕ СВЯЗЫВАНИЯ CAP



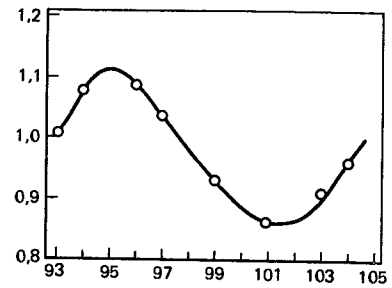
Б. ДВЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ИЗГИБА



В. CAP-CAP



Г. $(A_5N_5)_4$ -CAP



9-7 При связывании белка с последовательностью ДНК может произойти изгибание молекулы ДНК в результате ее взаимодействия с определенными химическими группами на поверхности белка. Подобный изгиб ДНК, вызванный белком, достаточно легко обнаружить при электрофорезе комплексов ДНК-белок в полиакриламидном геле. Скорость миграции изогнутой ДНК в геле зависит от расстояния между двумя концами: чем сильнее изогнута ДНК, тем ближе располагаются друг к другу ее концы и тем медленнее движение. Если на ДНК возникают два изогнутых участка, то расстояние между двумя концами зависит от того, имеют ли изгибы одно и то же (*цис*) или противоположное (*транс*) направление (рис. 9-6, А).

Вы показали, что при связывании белка-активатора катаболизма (CAP, от англ. catabolite activator protein) с регуляторным участком ДНК ее молекула изгибается под углом большим, чем 90° . Теперь вы хотели бы подробно изучить строение такого изгиба, чтобы понять, как изогнута ДНК в центре участка связывания с CAP и какая бороздка спирали ДНК при этом располагается внутри, малая или большая. Для ответа на этот вопрос вы готовите конструкции двух типов, показанные на рис. 9-6, Б. В одних вы встраиваете две последовательности, связывающие CAP, с каждой стороны от центрального участка, в который встраиваете последовательность длиной от 10 до 20 нуклеотидов. В конструкции другого типа вы помещаете с одной стороны от центрального участка последовательность, связывающую CAP, а с другой стороны-последовательность $(A_5N_5)_4$, про которую известно, что при изгибе большая бороздка располагается внутри

- ее центральной части. Вы определяете подвижность этих двух типов конструкций в геле и строите график ее зависимости от числа нуклеотидов, разделяющих точки изгиба (рис. 9-6, В и Г).
- Предполагая, что на один виток спирали ДНК приходится 10 нуклеотидов, определите число витков, разделяющих центры двух изгибов в двух участках связывания CAP, для случая, когда относительная подвижность минимальна. Сколько витков спирали разделяют центры изгибов, если относительная подвижность максимальна?
 - Соответствует ли отношение между относительной подвижностью и удаленностью друг от друга центров изгиба в участках связывания CAP тому, что *цис*-конфигурация мигрирует наиболее медленно, а *транс*-конфигурация — наиболее быстро? Объясните свой ответ.
 - Сколькими витками спирали разделены центры изгибов при минимальной подвижности в случае конфигурации с одним участком связывания CAP и одним участком связывания (A₅N₅)₄?
 - Какая бороздка спирали обращена внутрь изгиба в центре изгибающегося участка связывания CAP?

9-8 Вы изучаете структуру хроматина из клеточных ядер печени крысы. Проведя кратковременную обработку ядер микрококковой нуклеазой, затем выделение ДНК и электрофорез ДНК в агарозном геле, вы получаете лесенку из широких полос с регулярным интервалом, ширина которого соответствует разнице в длине между фрагментами примерно в 200 нуклеотидов. Если вместе с микрококковой нуклеазой использовать ДНКазу I, то на геле появляется растянутая зона шлейфа, на котором слабо видны полосы фрагментов, различающихся по длине на 200 нуклеотидов. Если же перед нанесением на гель денатурировать ДНК, обработанную ДНКазой I, то образуется иная лесенка из полос с регулярным интервалом, соответствующим разнице в 10 нуклеотидов.

Вы весьма озадачены тем, что с этими двумя ферментами получаются столь разные результаты. Когда вы рассказываете о результатах своих экспериментов коллегам, один из них предполагает, что подобное различие связано со стерическими свойствами ДНК-связывающих участков на этих двух ферментах: микрококковая нуклеаза может связывать и расщеплять только свободную ДНК, а ДНКазы I могут связывать и расщеплять как свободную ДНК, так и ДНК, связанную с поверхностью нуклеосомы. Ваш коллега высказывает предположение, что если ДНК, связанную с какой-либо поверхностью, обработать ДНКазой I, то должна образоваться лесенка из полос с интервалами в 10 нуклеотидов. Вы проверяете это предположение, связав ДНК с пластиковой поверхностью (чашка Петри), покрытой полилизинном, и обработав ее двумя ферментами: микрококковой нуклеазой, расщепляющей ДНК на крупные фрагменты, и ДНКазой I, разрезающей на такие фрагменты, которые различаются по длине на 10 нуклеотидов.

- Почему при кратковременной обработке ядер микрококковой нуклеазой получается набор полос, соответствующих фрагментам ДНК, каждый из которых отличается от следующего примерно на 200 нуклеотидов?
- Если вы подвергнете ядра более жесткой обработке микрококковой нуклеазой, то какой результат будет получен после фракционирования ДНК с помощью гель-электрофореза?

Время обр
0,5 1



Рис. 9-7. Из марсианской микрококковой нуклеазы (9-9). Справа — обработка ядер крысы.

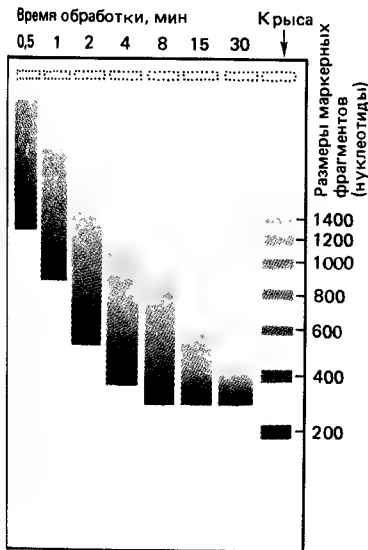


Рис. 9-7. Расщепление хроматина из марсианского микроорганизма микрококковой нуклеазой (задача 9-9). Справа приведены результаты обработки хроматина из печени крысы.

В. Объясните, как гипотеза вашего коллеги объясняет образование фрагментов, отличающихся друг от друга по длине на 10 нуклеотидов, при обработке ядер ДНКазой I.

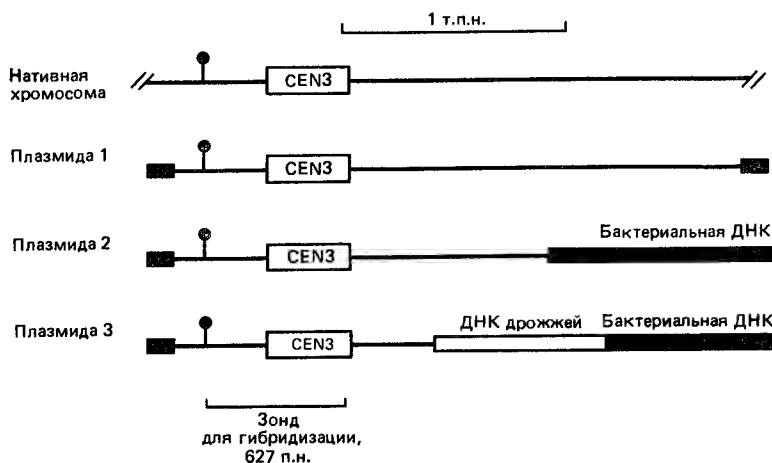
Вам передали первые образцы только что открытого марсианского микроорганизма, чтобы вы проанализировали его хромосомы. Клетки этого микроорганизма напоминают клетки эукариот, обитающих на Земле, и состоят из тех же молекул, включая ДНК, которая обнаружена в структуре, похожей на клеточное ядро. Один из ваших коллег идентифицировал два основных гистонподобных белка, связанных с ДНК (их масса примерно равна массе ДНК). Вы выделяете из клеток ядра и обрабатываете их микрококковой нуклеазой в течение разных периодов времени. Затем вы выделяете ДНК и разделяете ее в агарозном геле параллельно с аналогичным препаратом ДНК из ядер печени крысы. Как показано на рис. 9-7, продукты расщепления ДНК из печени крысы дают стандартную лесенку полос, характерную для нуклеосом, тогда как продукты расщепления ДНК марсианского микроорганизма проявляются в виде растянутых зон шлейфа, причем размер минимального фрагмента составляет около 300 нуклеотидов. В качестве контроля вы выделяете из марсианского микроорганизма ДНК, свободную от белков, и обрабатываете ее микрококковой нуклеазой. ДНК оказывается весьма чувствительной к этой нуклеазе, и конечными продуктами расщепления являются преимущественно моно- и динуклеотиды.

Указывают ли эти результаты на то, что в хроматине марсианского микроорганизма также содержатся структуры, подобные нуклеосомам? Если это так, то как расположены такие нуклеосомы по длине ДНК?

9-10 Строение нуклеосом в области центromеры представляет особый интерес в связи с тем, что центromера является областью присоединения хромосомы к микротрубочкам. Для прикрепления трубочек обычное расположение нуклеосом в хроматине, возможно, должно быть изменено. Вы собираетесь разобраться в этом вопросе, поскольку провели клонирование и определили последовательность нуклеотидов во фрагменте ДНК длиной около 2 т.п.н., который расположен вокруг центromеры (CEN3) дрожжевой хромосомы III. В результате вы можете изучить расположение нуклеосом не только в нативной хромосоме, но также и в плазмиде, с помощью которой вы клонировали различные по длине фрагменты той области хромосомной ДНК, которая окружает центromеру (рис. 9-8).

Вы выделяете хроматин из дрожжей дикого типа и из дрожжей, несущих отдельные плазмиды. Затем кратковременно обрабатываете эти препараты хроматина микрококковой нуклеазой, после чего депротеинизируете ДНК и обрабатываете ее нуклеазой BamHI, которая разрезает ДНК лишь в одном месте – в области центromеры (рис. 9-8). ДНК, обработанную таким образом, вы фракционируете с помощью гель-электрофореза и затем анализируете методом блот-гибридизации, используя в качестве зонда фрагмент радиоактивно меченной ДНК центromеры (рис. 9-8). Этот метод, называемый «непрямое мечение концов», позволяет выявить все фрагменты ДНК, начиная с ДНК, расположенной непосредственно справа от участка расщепления ферментом BamHI. Контрольный опыт состоит в том, что вы депротеинизируете препарат хроматина, чтобы получить чистую ДНК, обраба-

Рис. 9-8. Схема нативной хромосомы и трех плазмид, сконструированных вокруг CEN3 (задача 9-10). Нативная хромосома имеет линейную форму; ее концы на самом деле продолжают далеко за сайты, отмеченные диагональными линиями. Плазмиды представляют собой кольцевые молекулы, но здесь для удобства они изображены в линейной форме. Нативные дрожжевые последовательности, окружающие центромеру, обозначены линиями. Последовательности бактериальной ДНК в составе плазмиды изображены как черные прямоугольники. Дрожжевая ДНК в составе плазмиды 3, изображенная как светлый прямоугольник, представляет собой фрагмент хромосомной дрожжевой ДНК, отстоящий далеко от центромеры. Сайт разрезания BamHI показан черным кружком слева от центромеры. Область гибридизации с радиоактивным зондом указана внизу.



- тываете ее микрококковой нуклеазой и затем анализируете тем же способом. Результаты радиоавтографии приведены на рис. 9-9.
- Если не проводить обработку BamHI, то видны регулярные, хотя и не очень отчетливые полосы. Почему в результате расщепления BamHI картина делается более четкой и легко поддающейся интерпретации?
 - Нарисуйте схему локализации участков, чувствительных к микрококковой нуклеазе, и расположения нуклеосом вдоль хромосомы. Какие особенности отмечаются в области центромеры?
 - Почему в качестве контроля в эксперименте используется чистая ДНК?
 - На радиоавтограмме (рис. 9-9) видно, что полосы, относящиеся к той части хромосомной ДНК из дрожжей дикого типа, которая расположена за центромерой, отличаются друг от друга на одинаковое число нуклеотидов, а именно все полосы, начиная с 600 нуклеотидов и выше, разделены интервалом в 160 нуклеотидов. Связана ли такая регулярность с выстраиванием нуклеосом вблизи центромеры подобно машине при красном свете светофора? Или же эта регулярность определяется свойством самой последовательности ДНК? Объясните, как ваши результаты, полученные с плазмидами 1, 2 и 3, могут помочь ответить на этот вопрос.

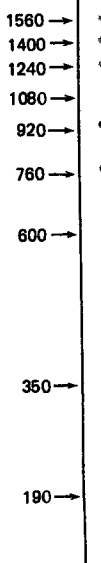


Рис. 9-9. Микрококковая нуклеаза (рис. 9-10) радиоавтография длины ф

Структура хромосомы (МБК 9.2)

9-11 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- Общим принципом структурной организации хромосом является по-видимому, наличие в них _____, которые представляют собой петли хроматина, отходящие под тем или иным углом от основной оси хромосомы.
- На стадии метафазы в процессе митоза две дочерние молекулы ДНК уложены каждая по отдельности в виде двух сестринских _____, которые соединены между собой с помощью центромер.
- Набор из 46 митотических хромосом человека называется _____ человека.
- Спаренные мейотические хромосомы в растущих ооцитах называют _____, так как петли хроматина у них необычно туго и вытянутые.
- Плотное прилегание одна к другой отдельных цепей хроматина

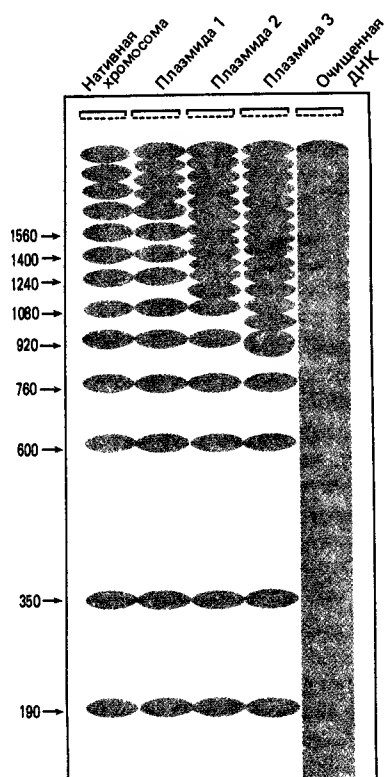


Рис. 9-9. Результаты обработки микрококковой нуклеазой около-центромерного участка ДНК (задача 9-10). На левой стороне радиоавтограммы указаны примерные длины фрагментов ДНК (п. н.).

в _____ приводит к значительному удлинению оси хромосомы и препятствует спутыванию цепей хроматина.

- Е. Активно транскрибируемые области на полиденных хромосомах деконденсируются и образуют хорошо различимые _____.
- Ж. _____ хроматин чрезвычайно чувствителен к действию нуклеазы. По-видимому, нуклеосомы в нем изменены таким образом, что их упаковка становится менее плотной.
- З. Небольшая фракция ДНК из клеток высших эукариот — это особая конденсированная форма ДНК, называемая _____. Эти участки ДНК остаются необычайно компактными в течение интерфазы и не транскрибируются.

9-12 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Петельные домены у столь несхожих организмов, как муха и человек, судя по всему, имеют в среднем одинаковые размеры, причем типичная петля содержит от 20 000 до 100 000 пар нуклеотидов.
- Б. Сверхспирализация хромосом в митозе, приводящая к уменьшению длины ДНК примерно в 10 000 раз, сопровождается интенсивным фосфорилированием гистона H1.
- В. Окрасивание митотических хромосом флуоресцентными красителями позволяет в основном отличать ДНК, богатую АТ-парами нуклеотидов (G-сегменты), от ДНК, обогащенной GC-парами (R-сегменты).
- Г. В хромосомах типа ламповых щеток большая часть хроматина находится в составе активно транскрибируемых петель, а небольшая часть хроматина остается в высококонденсированном состоянии в хромомерах, которые транскрипционно неактивны.
- Д. У личинок мух в секреторных клетках некоторых типов все копии гомологичных хромосом, синтезированных за несколько циклов репликации, остаются рядом друг с другом, что приводит к образованию гигантской полиплоидной хромосомы.
- Е. Изучение хромосомных пухов показало, что петельный домен, который, как полагают, должен сложиться, чтобы образовался хромосомный диск, в ходе транскрипции может деконденсироваться как отдельная единица.
- Ж. Данные классической генетики вместе с последними результатами молекулярно-биологических исследований показывают, что каждый диск на политенной хромосоме, вероятно, соответствует одному гену.
- З. При обработке ядер из различных клеток ДНКазой I в определенной концентрации разрушаются преимущественно те последовательности ДНК, которые в клетках данного типа активно транскрибируются.
- И. В активном хроматине нуклеосомы избирательно связывают два небольших близкородственных хромосомных белка HMG14 и HMG17.
- К. Транскрипционно неактивные области хромосом представляют собой ДНК в конденсированной форме, относительно устойчивой к нуклеазам; эту форму ДНК называют гетерохроматином.

9-13 Вы изучаете транскрипцию на хромосомах типа ламповых щеток у тритона *Triturus*, вводя ^3H -уридин в ооциты и определяя через равные промежутки времени радиоактивную РНК методом радиоавтографии. Сначала вы исследуете самые большие петли. Метка включается постепенно вдоль всей петли, как это показано на рис. 9-10. Процесс мечения всей петли занимает 14 сут. Проведя

Рис. 9-10. Радиоавтография гигантской хроматиновой петли в препарате хромосом типа ламповых щеток из тритона (задача 9-13). Стрелками указано распространение меченых областей вдоль петли в разные моменты времени после введения в оцит меченого уридина.



сравнение его с процессом мечения маленьких петель, гораздо чаще встречающихся в хромосомах типа ламповых щеток, вы удивлены результатами: петли меньшего размера метятся равномерно даже за очень короткие промежутки времени. При увеличении времени инкубации интенсивность мечения увеличивается равномерно вдоль всей петли.

Многие петли в хромосомах типа ламповых щеток представляют собой отдельные единицы транскрипции, в которых РНК-полимераза начинает и заканчивает синтез у основания петли, как показано на рис. 9-11. Если петля, которую вы изучаете, представляет собой отдельную единицу транскрипции, то как будет происходить мечение петли: постепенно, как в случае больших петель (рис. 9-10), или одновременно по всей длине, как в петлях меньшего размера?

9-14 Гигантские политенные хромосомы *Drosophila melanogaster* давно привлекают внимание генетиков, потому что характерная для них исчерченность создает различимую глазом карту генома. Диски содержат, по-видимому, большее количество ДНК, чем междисковые участки. Возникает ли эта разница в связи с тем, что в дисках ДНК реплицируется более интенсивно, чем в междисковых участках, или же вся ДНК реплицируется одинаково, но уложена она таким образом, что диски содержат больше ДНК, чем междисковые участки?

Вы можете найти ответ на этот вопрос, поскольку получили последовательный ряд клонов, который охватывает отрезок длиной 315 т. п. н. ДНК дрозофилы, включающий примерно 12 дисков и междисковых участков. В качестве зондов для гибридизации вы можете использовать радиоактивно меченные фрагменты этих клонов, чтобы определить количество комплементарной им ДНК, присутствующей в диплоидных тканях и политенных хромосомах. Вы выделяете ДНК из диплоидных тканей и политенных хромосом, обрабатываете равные количества ДНК рестриктазами, взятыми в различных сочетаниях, разделяете фрагменты путем гелевого электрофореза и переносите их на нитроцеллюлозные фильтры для гибридизации. В каждом случае набор фрагментов, образовавшихся при рестрикции, одинаков для ДНК из диплоидных тканей и политенных хромосом, как показано на рис. 9-12. Вы измеряете интенсивность полос многих специфических фрагментов, образовавшихся при рестрикции, и выражаете результат как отношение интенсивности полос фрагментов из политенных хромосом к интенсивности полос соответствующих им фрагментов из диплоидных тканей (рис. 9-13).

Подтверждают ли ваши результаты предположение о том, что в основе различия между дисками и междисковыми участками лежит дифференциальная репликация, или же данные говорят в пользу различий в упаковке?

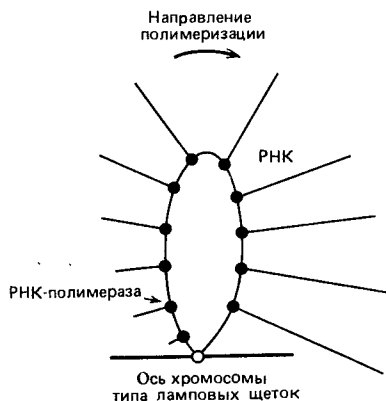


Рис. 9-11. Схематическое изображение хроматиновой петли, представляющей собой одну транскрипционную единицу (задача 9-13). Продвижение молекул РНК-полимеразы вдоль петли отражено в удлинении новосинтезированных цепей РНК, связанных с каждой полимеразой.



Рис. 9-12. РНК-гибридизация хромосом (D) (задача 9-13). Обозначены моменты ДНК-контракции зонды изученной длины. Фрагмент 2 генома, он ровки коли- ного на гел

Рис. 9-13. ДНК в раз- из диплоид- ных хром- мент хром- клонирова- фрагмента- нем указан- и диски. К- ты изобра- отмечено р- тов 2851- фрагмент- уровней ег- политенн- диплоидн-

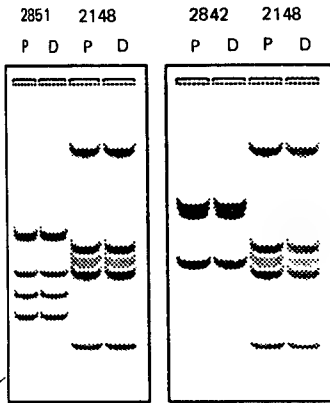


Рис. 9-12. Радиоавтограф, полученный при анализе методом блот-гибридизации ДНК из полигенных хромосом (P) и диплоидных тканей (D) (задача 9-14). Числа наверху обозначают клонированные фрагменты ДНК, использованные в качестве зондов: 2851 и 2842 фрагменты изучаемой области, имеющей длину 315 т. п. н. (см. рис. 9-13); фрагмент 2148 из другой области генома, он использован для калибровки количества ДНК, нанесенного на гель.

Рис. 9-13. Соотношение количеств ДНК в разных участках хромосом из диплоидных тканей и полигенных хромосом (задача 9-14). Сегмент хромосомы, покрываемый клонированными рестрикционными фрагментами, изображен внизу, на нем указаны хромосомные области и диски. Клонированные фрагменты изображены над хромосомой, отмечено расположение фрагментов 2851 и 2842. Над каждым фрагментом указано отношение уровней его гибридизации с ДНК из полигенных хромосом и с ДНК из диплоидных тканей.

9-15 Для выяснения взаимосвязи между структурой хроматина и экспрессией гена вы изучаете два типа клеток цыпленка. Эритроциты цыпленка экспрессируют большие количества глобиновой мРНК, а в фибробластах глобин вообще не синтезируется. Вы хотите выяснить, в одинаковых или в разных хроматиновых структурах находятся последовательности ДНК, кодирующие глобин в этих двух типах клеток. Для изучения структуры хроматина вы используете две нуклеазы: микрококковую нуклеазу и панкреатическую дезоксирибонуклеазу I (ДНКазы I).

Вы готовите меченную ^3H -тимидином ДНК (кДНК), комплементарную глобиновым мРНК из эритроцитов. Эта глобиновая кДНК полностью расщепляется нуклеазой, узнающей одноцепочечные участки ДНК (нуклеаза S1). Однако если вначале провести гибридизацию кДНК с избытком ДНК цыпленка, то более 90% препарата окажется устойчиво к последующей обработке нуклеазой S1.

Вы изучаете действие микрококковой нуклеазы и ДНКазы I на способность ДНК из эритроцитов и фибробластов предохранять кДНК. Чтобы сохранить природную организацию хроматина, вы обрабатываете нуклеазой выделенные ядра до того, как экстрагируете ДНК и проводите гибридизацию. При обработке ядер из эритроцитов или фибробластов микрококковой нуклеазой (до такого состояния, когда разрушается около 50% ДНК) получают препараты ДНК, еще способные защитить от последующего расщепления нуклеазой S1 более 90% кДНК. Аналогичным образом при обработке ядер фибробластов ДНКазой I (до такого состояния, когда разрушается менее 20% ДНК) полученные препараты ДНК предохраняют более 90% кДНК. Однако при такой же обработке ядер эритроцитов ДНКазой I получают препараты ДНК, способные предохранить лишь около 25% кДНК. Эти результаты суммированы в табл. 9-1.

Вы повторяете некоторые из этих измерений, используя вместо глобиновой кДНК суммарную ДНК из эритроцитов, меченную ^3H -тимидином. Гибридизация с общей ДНК или с ДНК, обработанной микрококковой нуклеазой, обеспечивает защищенность более 90% ДНК, меченной ^3H -тимидином, а гибридизация с ДНК, обработанной ДНКазой I, всего лишь 78% ^3H -ДНК (табл. 9-1).

В последней серии экспериментов вы сначала получаете препарат нуклеосом, обрабатывая хроматин микрококковой нуклеазой. ДНК нуклеосом предохраняет более 90% глобиновой кДНК. После обработки нуклеосом ДНКазой I получается ДНК, предохраняющая всего лишь 25% глобиновой кДНК. Далее вы подвергаете нуклеосомы кратковременному воздействию трипсина, чтобы удалить 20–30 аминокислот с N-конца каждой молекулы гистонов, дополнительно расщепляете модифицированные нуклеосомы микрококковой нуклеазой и выделяете ДНК. Такая ДНК

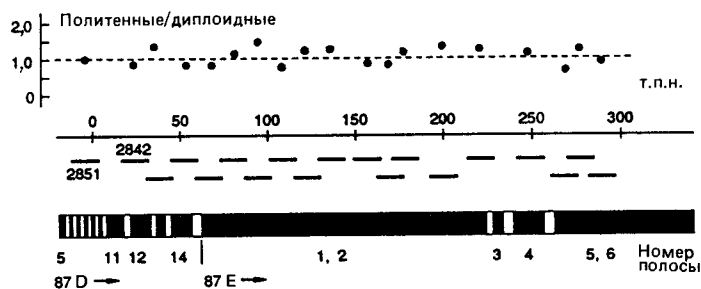


Таблица 9-1. Защита кДНК глобина и суммарной ДНК из эритроцитов препаратами хроматина, обработанными и не обработанными нуклеазой (задача 9-15)

Избыток ДНК	Обработка нуклеазой	Защищенная кДНК глобина	Защищенная ДНК из эритроцитов, %
Общая ДНК	Без обработки	93	95
ДНК из эритроцитов	Микрококковая нуклеаза	92	94
ДНК из эритроцитов	ДНКаза I	25	78
ДНК из фибробластов	Микрококковая нуклеаза	91	
ДНК из фибробластов	ДНКаза I	91	
Нуклеосомы	Без обработки	91	94
Нуклеосомы	ДНКаза I	25	80
Нуклеосомы, обработанные трипсином	Микрококковая нуклеаза	25	83

предохраняет 83% суммарной ДНК эритроцитов, но всего лишь 25% глобиновой кДНК (табл. 9-1).

- А. Какая из нуклеаз — микрококковая или ДНКаза I — расщепляет экспрессирующий хроматин (активный хроматин)? Как можно это определить?
- Б. Какая фракция ДНК эритроцитов входит в состав активного хроматина?
- В. На случайную или на специфическую, чувствительную к микрококковой нуклеазе, популяцию нуклеосом действует трипсин? Как это определить?
- Г. Определяется ли отличие активного хроматина от всего остального хроматина свойствами отдельных нуклеосом или же оно связано с тем, как упакованы нуклеосомные частицы в структуре более высокого порядка в клеточном ядре?

Репликация хромосом (МБК 9.3)

9-16 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Фаза клеточного цикла, в ходе которой происходит синтез ДНК называется _____.
- Б. _____ ДНК иницируется на определенной последовательности ДНК, которая называется _____.
- В. Точки начала репликации обычно активируются в составе кластеров, включающих 20–80 таких сайтов и называемых _____.
- Г. Множественные копии _____ SV40 специфически связываются с сайтом (точкой) начала репликации SV40 и действуют временно как белок, участвующий в инициации, и как ДНК-геликаза, чтобы открыть спираль ДНК в этом сайте.
- Д. Поскольку весь геном должен быть реплицирован только однократно, точки начала репликации в эукариотической клетке должны инактивироваться по мере их использования; эти _____ ДНК удаляется во время или перед началом митоза.

9-17 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Репликативная вилка у бактерий и эукариот передвигается

- одинаковой скоростью, из чего следует, что упаковка ДНК в хроматин не препятствует процессу репликации.
- Б. Элементы ARS у дрожжей содержат, по-видимому, многочисленные копии АТ-богатой консенсус-последовательности (обобщенной последовательности) в пределах участка размером 100 нуклеотидов.
 - В. Эукариотам необходимы два типа ДНК-полимераз: ДНК-полимераза альфа на отстающей цепи и ДНК-полимераза дельта на ведущей цепи.
 - Г. Как и большинство белков, гистоны непрерывно синтезируются на протяжении интерфазы, но связываются с ДНК для образования нового хроматина лишь во время S-фазы.
 - Д. Цепь теломеры с высоким содержанием G, всегда расположенная на 3'-конце молекулы ДНК, может загигаться назад, образуя особую структуру со спаренными основаниями G—G, которая и защищает конец хромосомы.
 - Е. Области хромосом реплицируются как отдельные крупные единицы, при этом разные области каждой хромосомы реплицируются в строго определенном порядке.
 - Ж. У самок млекопитающих две X-хромосомы, из которых активна лишь одна, в ходе S-фазы реплицируются одновременно.
 - 3. Гены, активные только в некоторых типах клеток, обычно реплицируются на более ранней стадии митоза в тех клетках, где они активны, и на более поздней стадии — в клетках других типов.
 - И. Большая часть GC-богатых полос (R-сегменты) реплицируется в первой половине S-фазы, а большинство АТ-богатых полос (G-сегменты) реплицируется во второй половине S-фазы.
 - К. Если клетку, находящуюся в S-фазе, слить с клеткой, находящейся в G₂-фазе, синтез ДНК в G₂-ядре индуцируется; если же клетку в S-фазе слить с клеткой в G₁-фазе, то в G₁-ядре синтез ДНК не стимулируется.

9-18 Вы изучаете синтез ДНК в линии культивируемых клеток, используя стандартную методику. Согласно этой методике, к клеткам добавляют ³H-тимидин, который включается в репликативные вилки. Затем клетки осторожно лизируют в диализном мешочке, чтобы из них вышла ДНК. При прокалывании мешочка и медленном выпуске из него раствора некоторые цепи ДНК прилипают к стенкам и растягиваются в направлении тока жидкости. Этот метод позволяет выделить в интактном виде очень длинные цепи ДНК. При этом из-за натяжения цепей репликационные глазки смыкаются, в результате чего дочерние дуплексы лежат бок о бок. Мешочек с прилипшими к нему цепями ДНК укрепляют на предметном стекле, покрывают фотоэмульсией и экспонируют от 3 до 6 мес. Меченая ДНК проявляется в виде треков из зерен серебра.

Для синхронизации клеток на этапе начала S-фазы вы подвергаете их предварительной обработке. В одном варианте опыта вы прекращаете блокаду синтеза, применяемую для синхронизации, и немедленно вводите ³H-тимидин. Через 30 мин вы промываете клетки и заменяете среду, так чтобы концентрация метки составляла около 30% от первоначальной. Еще через 15 мин вы готовите ДНК для радиоавтографии. Результаты этого эксперимента приведены на рис. 9-14, А. Во втором варианте опыта вы прекращаете блокаду синтеза, применяемую для синхронизации, затем ждете 30 мин и только тогда добавляете ³H-тимидин. Через 30 мин инкубации с ³H-тимидином вы вновь меняете среду, чтобы снизить

Рис. 9-14. Результаты радиоавтографии в эксперименте по изучению репликации ДНК в культивируемых клетках (задача 9-18). *А.* Клетки помечены сразу после прекращения синхронизирующей блокады. *Б.* Клетки помечены через 30 мин после прекращения синхронизирующей блокады.

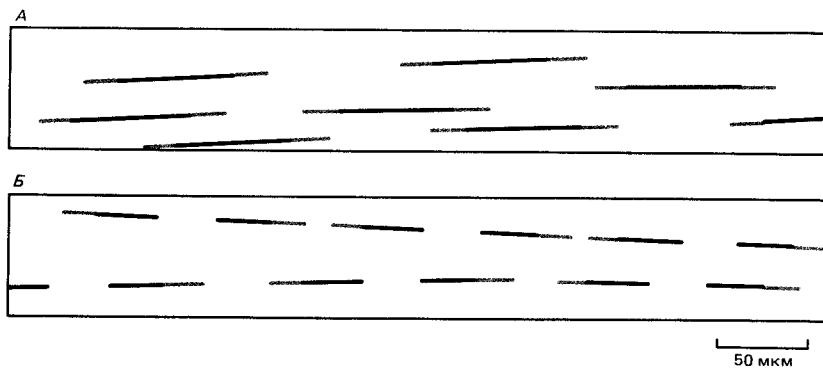


Рис. 9-15. Форез мо-
нием (*А*),
ным репл
двумя раз
метрично
ционным
В верхней
жены про
зующиеся
условного
1 т. п. н. Е
показано,
процесса
ются в ге

концентрацию меченого тимидина, и инкубируете клетки еще 15 мин. Результаты второй серии экспериментов приведены на рис. 9-14, *Б*.

- А.* Объясните, почему в обоих экспериментах некоторые участки треков оказались плотно заполненными гранулами серебра (темные участки), а другие - менее плотно (светлые участки).
- Б.* В первом опыте каждый трек имеет центральную темную часть и светлые участки на каждом конце. Во втором опыте светлый участок есть только на одном конце каждого трека. Объясните, почему наблюдается такая разница в результатах этих двух экспериментов.
- В.* Определите скорость движения репликативной вилки (мкм/мин) в этих экспериментах. Совпадают ли результаты, полученные в двух опытах? Можно ли использовать эти данные для того, чтобы определить, сколько времени необходимо для репликации всего генома?

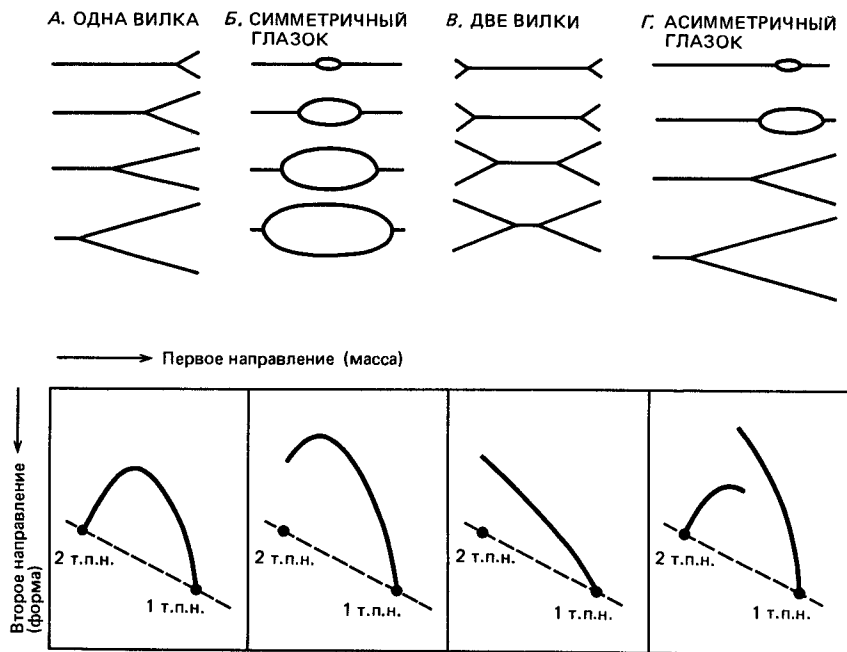
9-19 Полагают, что автономно реплицирующиеся последовательности (ARS), сообщающие стабильность плазмидам дрожжей, являются точками начала репликации. Однако доказать это весьма сложно. Трудность состоит главным образом в выделении достаточного количества определенных реплицирующихся молекул ДНК. Это препятствие можно обойти, используя двумерный гель-электрофорез, который позволяет разделить молекулы ДНК по размеру в одном направлении и по форме - в другом. Из-за того, что у реплицирующихся молекул имеются разветвления, они мигрируют во втором направлении медленнее, чем линейные молекулы с той же массой. Разрезая реплицирующиеся молекулы рестриктазами, можно получить ряд различных разветвленных форм, дающих в двумерном геле характерное распределение (рис. 9-15).

Вы используете этот метод для изучения репликации плазмид, содержащей ARS1. Чтобы увеличить количество реплицирующихся плазмидных молекул, вы синхронизируете культуру дрожжей и выделяете ДНК из клеток, находящихся в S-фазе. Затем вы обрабатываете ДНК ферментом BglII или PvuI, которые разрезают плазмиду, как показано на рис. 9-16, *А*. Вы разделяете фрагменты ДНК с помощью двумерного гель-электрофореза и проводите радиоавтографию, чтобы можно было увидеть результаты (рис. 9-16, *Б*).

Рис. 9-16. С
ARS1 (*А*) и
гель-электр
обработанны
и PvuI (*Б*)

- А.* Что представляет собой интенсивное пятно, возникшее в результате

Рис. 9-15. Двумерный гель-электрофорез молекул с одним разветвлением (А), симметрично расположенным репликационным глазком (Б), двумя разветвлениями (В) и асимметрично расположенным репликационным глазком (Г) (задача 9-19). В верхней части рисунка изображены промежуточные формы, образующиеся в процессе репликации условного фрагмента длиной 1 т.п.н. В нижней части рисунка показано, как такие интермедиаты процесса репликации распределяются в геле.

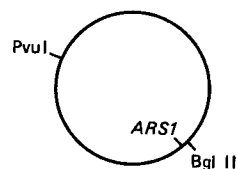


тате гибридизации и расположенное на обоих гелях в положении, соответствующем 4,5 т.п.н. (рис. 9-16, Б)?

- Б. Доказывают ли результаты этого эксперимента, что ARS1 является точкой начала репликации? Объясните ваш ответ.
- В. На том геле, где разделяли материал, обработанный PvuI (рис. 9-16, Б), в дугообразной линии зоны гибридизации имеется разрыв. В чем причина этого?

9-20 Одно из основных правил репликации эукариотических ДНК состоит в том, что ни одна хромосома или ее часть не может реплицироваться более одного раза за клеточный цикл. Для того чтобы вирусы эукариот могли образовать свои многочисленные копии за один клеточный цикл, они должны обойти или изменить это правило. Например, вирус животных SV40 за один цикл инфекции образует 100 000 копий своего генома. Чтобы достичь этой цели, вирус синтезирует специальный белок, называемый Т-антигеном (в связи с тем, что сначала он был выявлен иммунологическими методами). Т-антиген связывается с точкой начала репликации вируса SV40 и каким-то образом инициирует синтез ДНК.

А. ПЛАЗМИДА



Б. РАЗДЕЛЕНИЕ В ГЕЛЕ

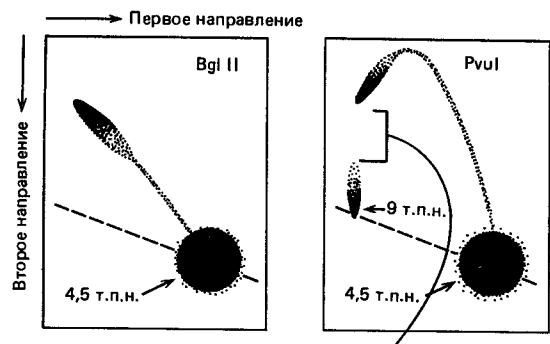
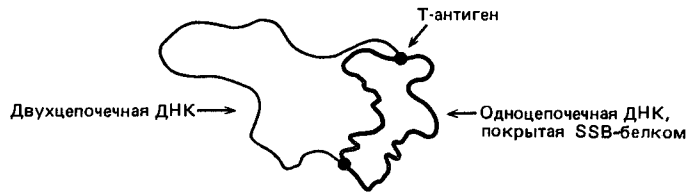


Рис. 9-16. Строение плазмиды ARS1 (А) и результаты двумерного гель-электрофореза этой плазмиды, обработанной рестриктазами BglII и PvuI (Б) (задача 9-19).

Рис. 9-17. Типичный пример плазмиды, содержащей точку начала репликации вируса SV40, после инкубации с Т-антигеном, белком, связывающимся с одноцепочечными молекулами (SSB-белок) и АТФ (задача 9-20).



Механизм, посредством которого Т-антиген инициирует репликацию, изучали *in vitro*. Если в присутствии очищенного Т-антигена, АТФ и SSB (single-strand binding)-белка, связывающегося с одноцепочечной ДНК, инкубировать кольцевую плазмидную ДНК, несущую точку начала репликации SV40, то с помощью электронного микроскопа можно наблюдать частично расплетенные структуры (рис. 9-17). Когда одного из этих компонентов нет, расплетенные структуры отсутствуют. Расплетения не происходит и в том случае, если в точно такой же плазмиде в точке начала репликации имеется делеция 6 нуклеотидов. При очень осторожном выделении, не допускающем появления одноцепочечных разрывов (т.е. когда выделена ковалентно-замкнутая кольцевая ДНК), подобных расплетенных структур не наблюдается, пока в инкубационную смесь не добавлена топоизомераза I.

- Какой дополнительной активностью кроме сайт-специфического связывания с ДНК должен обладать Т-антиген? Какую роль может играть такая активность в инициации синтеза ДНК?
- Эти эксперименты показывают, что структуры, наблюдаемые с помощью электронного микроскопа, расплетены в области точки начала репликации вируса SV40. Положение этой точки в геноме SV40 известно. Как с помощью рестриктаз доказать, что это именно точка начала репликации, и определить, в одном или двух направлениях происходит расплетение этого участка?
- Если плазмидная ДНК представляет собой ковалентно замкнутое кольцо, то для чего нужна топоизомераза I? (Топоизомераза I вносит в двуспиральную ДНК одноцепочечные разрывы и затем быстро их зашивает, так что разрывы существуют лишь в течение очень короткого промежутка времени).
- Изобразите структуру, которая могла бы получиться, если бы Т-антиген постоянно индуцировал репликацию в точке начала репликации вируса SV40, встроенной в геном.

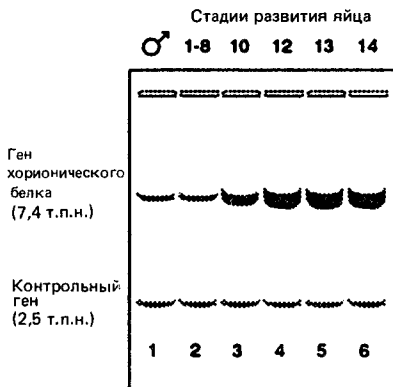


Рис. 9-18. Блот-гибридизация гена белка хориона и контрольного гена на разных стадиях развития яйца (задача 9-21).

9-21 Оболочка яйца дрозофилы состоит более чем из 15 различных белков хориона, которые синтезируются фолликулярными клетками, окружающими яйцеклетку на поздних стадиях развития яйца. Гены белков хориона сгруппированы в два кластера, один из которых расположен на 3-й хромосоме, а другой – на X-хромосоме. В каждом кластере гены расположены близко друг к другу, и их разделяет расстояние всего лишь в несколько сот пар нуклеотидов. В ходе развития яйцеклетки число копий генов, кодирующих белки хориона, увеличивается благодаря дополнительной репликации сегмента хромосомы, в котором тот или иной ген расположен. Подобную амплификацию можно обнаружить, если из яиц, находящихся на разных стадиях развития, выделить ДНК, обработать ее рестриктазой и провести блот-гибридизацию, используя в качестве зонда кДНК для белков хориона. Как показано на рис. 9-18, число генов, кодирующих белки хориона, постоянно увеличивается между стадиями 8 и 12, а число копий контрольного гена, не входящего в состав этого кластера, остается постоянным. Уровень

Коэффициент амплификации
60
40
20
0

Рис. 9-
в обла
окуж
щих б

Рис. 9-
ДНК п
ее в оп
(задача
ченные
цикла.
после
Фракци
(тяжел
фракци
(легки
специф
вирусу
шим м
перед и
сивном
товым
реплика

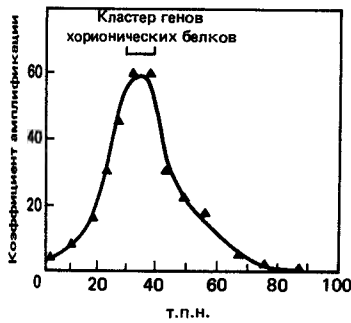


Рис. 9-19. Уровни амплификации в областях хромосомы, которые окружают кластер генов, кодирующих белки хориона (задача 9-21).

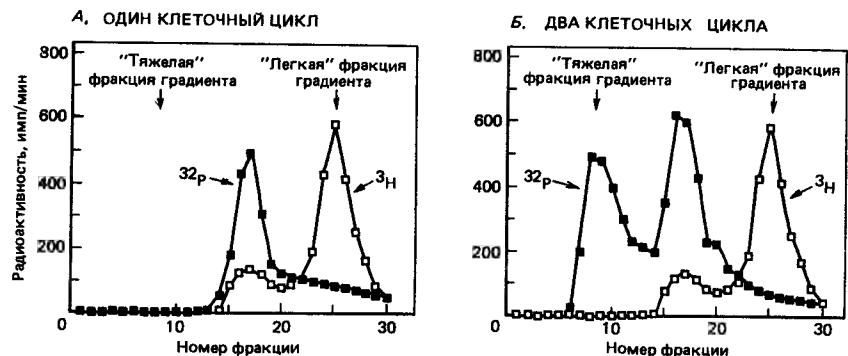
амплификации в области кластера генов, кодирующих белки хориона, можно определить, используя клонированные зонды, содержащие все последовательности ДНК из этой области. Измерение относительных интенсивностей зон на радиоавтографе (рис. 9-18) показало, что амплификация кластера генов, кодирующих белки хориона, на хромосоме 3 достигает максимума в области данных генов, но распространяется также и на участки протяженностью примерно 50 т.п.н. с каждой стороны этого кластера (рис. 9.19).

Последовательность ДНК, ответственная за амплификацию кластера генов, кодирующих белки хориона, — это сегмент размером 510 нуклеотидов, находящийся непосредственно перед одним из генов хорионических белков. Если перенести этот сегмент в другое место в геноме (с помощью транспозонов, переносящих ДНК), то образовавшиеся новые сайты в фолликулярных клетках тоже начинают амплифицироваться. Причем, по-видимому, этот элемент, контролирующий амплификацию, не транскрибируется и его белковый продукт не синтезируется.

- Изобразите, как может выглядеть ДНК из амплифицирующегося кластера под электронным микроскопом.
- Сколько циклов репликации необходимо для достижения 60-кратной амплификации?
- Каким образом, по вашему мнению, этот элемент размером 510 нуклеотидов может способствовать избыточной репликации кластера генов хорионических белков?

9-22 Оплодотворенные яйца (икринки) лягушки служат удобным объектом для изучения регуляции синтеза ДНК в ходе клеточного цикла. В яйца можно ввести чужеродную ДНК и изучать ее репликацию независимо от репликации хромосомной ДНК. Например, в одной из работ в яйца была инъецирована вирусная ДНК, меченная ^3H . Затем их инкубировали в присутствии ^{32}P -dCTP и немеченого бромдезоксириндифосфата — аналога тимидина, увеличивающего плавучую плотность ДНК, в которую он включился. Инкубация продолжалась в течение достаточно длительного промежутка времени, чтобы успели пройти один или два клеточных цикла. Затем вирусную ДНК выделяли из яиц и анализировали в градиенте плотности CsCl , где можно разделить ДНК, содержащую 0, 1 или 2 цепи, включившие 5-бромурацил-дезоксирибозид (БУДР). На рис. 9-20, А и Б показано распределение вирусной ДНК по плотности после инкубации в течение соответственно одного и двух клеточных циклов. Если яйца инкубировали в присутствии циклогексимида (ингибитор белкового

Рис. 9-20. Распределение вирусной ДНК по плотности после введения ее в оплодотворенные яйца лягушки (задача 9-22). А. Результаты, полученные после одного клеточного цикла. Б. Результаты, полученные после двух клеточных циклов. Фракции с большей плотностью («тяжелые») расположены слева; фракции с меньшей плотностью («легкие») — справа. Возможность специфически определять только вирусную ДНК достигнута следующим методическим приемом: яйца перед инъекцией подвергли интенсивному облучению ультрафиолетовым светом, чтобы блокировать репликацию хромосом.



синтеза), то результаты, полученные после одного и после двух клеточных циклов, были одинаковыми (рис. 9-20, А).

- А. Объясните, как три пика плотности на рис. 9-20 связаны с репликацией инъецированной ДНК. Почему в «легком» пике не присутствует радиоактивность ^{32}P , а «тяжелый» не содержит ^3H ?
- Б. Имитирует ли инъецированная ДНК ожидаемое поведение хромосомной ДНК?
- В. Как вы полагаете, почему циклогексимид препятствует появлению пика ДНК с наибольшей плотностью?

Синтез и процессинг РНК (МБК 9.4)

9-23 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Транскрипция начинается, когда молекула _____ связывается с промоторной последовательностью ДНК.
- Б. Сигма-субъединица РНК-полимеразы *E. coli* играет особую роль в транскрипции, являясь _____: она позволяет ферменту находить обобщенную последовательность промотора *E. coli*.
- В. После того как синтезируются первые восемь нуклеотидов молекулы РНК, сигма-субъединица отделяется, и вместо нее с ферментом соединяется несколько _____.
- Г. _____ транскрибирует гены, которые впоследствии будут транслироваться в белок, _____ синтезирует крупные молекулы рибосомных РНК, а _____ продуцирует разнообразные очень мелкие стабильные РНК.
- Д. Для образования активного промотора с ДНК должны связаться один или более сайт-специфических белков, которые называются _____.
- Е. TFIID, необходимый для многих промоторов РНК-полимеразы II, представляет собой крупный белковый комплекс, который обычно называют _____, так как он может связываться с консервативной АТ-богатой последовательностью, называемой _____.
- Ж. У эукариот молекулы РНК-полимеразы начинают и заканчивают транскрипцию в определенных сайтах хромосомы. Область между этими сайтами называется _____.
- З. Транскрипты, образуемые в ядре РНК-полимеразой II, известны под названием _____, поскольку самой первой характеристикой, позволившей отличить их от других молекул РНК в ядре, было именно разнообразие их размеров.
- И. Транскрипты, образуемые РНК-полимеразой II, выходят из ядра в виде молекул _____.
- К. При добавлении к 5'-концу первичного транскрипта метилированного нуклеотида G образуется _____, который, по-видимому, защищает растущую РНК от деградации и играет важную роль в инициации синтеза белка.
- Л. 3'-Конец большинства транскриптов, синтезируемых РНК-полимеразой II, определяется после модификации, в ходе которой растущий синтезируемый транскрипт расщепляется в определенном сайте и к образовавшемуся 3'-концу особой полимеразой добавляется _____.
- М. Модификации на 5'- и 3'-концах цепи РНК завершают формирование _____.
- Н. После удаления интронной последовательности кодирующие последовательности РНК по обеим сторонам интрона соединяются _____.

ся друг с другом в ходе реакции, известной под названием _____.

- О. У эукариот новосинтезированная РНК, по-видимому, сразу же конденсируется с образованием расположенных близко друг от друга белок-содержащих частиц, называемых частицами _____.
- П. Небольшие U-РНК в клеточном ядре соединяются с белками с образованием _____.
- Р. Консервативные последовательности на границах интрона называют _____ (донорный сайт) и _____ (акцепторный сайт).
- С. Крупный многокомпонентный рибонуклеопротеиновый комплекс, осуществляющий сплайсинг первичного транскрипта, называется _____.
- Т. У больных с _____ наблюдается аномально низкий уровень гемоглобина — белка, входящего в состав эритроцитов и переносящего кислород.
- У. Соединение молекул рРНК с рибосомными белками происходит в ядре, в крупной, хорошо различимой структуре, называемой _____.
- Ф. Каждый кластер генов рРНК образует область _____.

9-24 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. В составе РНК-полимеразы *E. coli* всегда есть факторы инициации и элонгации, что позволяет ей узнавать обобщенные последовательности промотора и наращивать цепь РНК.
- Б. РНК-полимеразы I, II и III состоят из многих субъединиц, ни одна из которых не содержится во всех трех полимеразах сразу.
- В. Бактериальные РНК-полимеразы могут связываться непосредственно с промотором, а эукариотические РНК-полимеразы могут связаться со своим промотором только в присутствии дополнительных белковых факторов, которые предварительно присоединились к ДНК.
- Г. Разные сайты начала синтеза у РНК-полимеразы II сильно отличаются друг от друга по эффективности действия, и, таким образом, некоторые гены транскрибируются с гораздо более высокими скоростями, чем остальные.
- Д. 3'-Конец большинства транскриптов, образуемых РНК-полимеразой II, формируется при терминеции транскрипции, когда к освободившемуся 3'-концу быстро присоединяется последовательность poly(A).
- Е. Лишь около 5% РНК, синтезируемой РНК-полимеразой II, достигает цитоплазмы: вся остальная распадается в ядре.
- Ж. Сплайсинг РНК происходит в ядре, где рибосомы отсутствуют, и РНК экспортируется в цитоплазму только по завершении процессинга.
- З. Частицы гяРНП и мяРНП похожи на рибосомы, так как каждая из них содержит много полипептидных цепей, образующих комплекс со стабильной молекулой РНК.
- И. Поскольку интроны представляют собой главным образом «связку» между генами, то совсем необязательно, чтобы в ходе сплайсинга они были вырезаны из первичного транскрипта с большой точностью.
- К. Сплайсинг РНК дает возможность получать из одного и того же первичного транскрипта РНК несколько разных мРНК и соответственно несколько разных белков.

- Л. Главное различие между самосплайсирующимися интронами группы I и II состоит в том, что у интронов группы I атакующий нуклеотид свободен, а у интронов группы II он входит в состав интронной последовательности.
- М. В клетках большинства позвоночных кластер генов, кодирующих 28S-рРНК, транскрибируется независимо от кластера генов, кодирующих 18S- и 5,8S-рРНК.
- Н. Рибосомные РНК образуются в ядрышке — специализированной области ядра, а затем переносятся в цитоплазму, где они связываются с рибосомными белками и образуют рибосомы.
- О. В отличие от цитоплазматических органелл ядрышко не ограничено мембраной.
- П. В клетках, находящихся на стадии метафазы, ядрышко отсутствует.
- Р. Полагают, что деконденсированные хромосомы в интерфазных клетках в значительной степени переплетены между собой.

9-25 Вы измучились с определением факторов специфической транскрипции: все процедуры довольно длительны, а факторы часто оказываются нестабильными. К тому моменту, когда вам наконец удастся идентифицировать искомую фракцию, фактор уже теряет свою активность. И вот в один прекрасный день вам в голову приходит блестящая идея по поводу того, как ускорить определение. Вы придумали, что можно получить последовательность ДНК, не содержащую С, встроить ее рядом с промотором и проинкубировать такую конструкцию в соответствующей реакционной смеси. В этом случае с промотора будут синтезироваться транскрипты, не содержащие G. В отсутствие GTP на сконструированной вами последовательности ДНК будет синтезироваться единственный длинный транскрипт РНК. Если это удастся показать, то вы сможете легко определять специфическую транскрипцию, просто измеряя включение меченого нуклеотида.

Для проверки своей идеи вы конструируете две плазмиды, несущие такие тест-последовательности ДНК: одну плазмиду с промотором из аденовируса (pML1) и другую без него (pC1). Вы смешиваете каждую из этих двух плазмид с очищенной РНК-полимеразой II, вашими лучшими препаратами факторов транскрипции и ^{32}P -СТР. Кроме того, вы добавляете в разных сочетаниях GTP, РНКазу T1, разрезающую РНК рядом с каждым G, и 3'-О-метил-GTP, который при включении в растущую цепь РНК терминирует транскрипцию. Вы определяете продукты реакции с помощью гель-электрофореза, результаты которого показаны на рис. 9-21.

- А. Почему транскрипт размером 400 нуклеотидов, отсутствующий на дорожке 4, присутствует на дорожках 2, 6, и 8?
- Б. Можете ли вы определить, почему происходит синтез в образце, нанесенном на дорожку 3, где взята плазида, не несущая промотора?
- В. Почему транскрипт размером 400 нуклеотидов присутствует на дорожке 5, а на дорожке 7 отсутствует?
- Г. Вы разработали этот хитроумный метод, чтобы определить факторы транскрипции. Один из ваших коллег замечает, что идентификацию нужно проводить сначала в грубых экстрактах, которые содержат GTP. Сможете ли вы определить специфическую транскрипцию в грубых экстрактах? Как это сделать?

9-26 Используя свой быстрый метод определения специфической тран-

Рис. 9-21. Ст (А) и резул транскрипции (Б) (задача 9 ные смеси де меразу II, фа и ^{32}P -СТР. Р нентов отме дорожкой: (—) понент прису смеси, (—) от отсутствует.

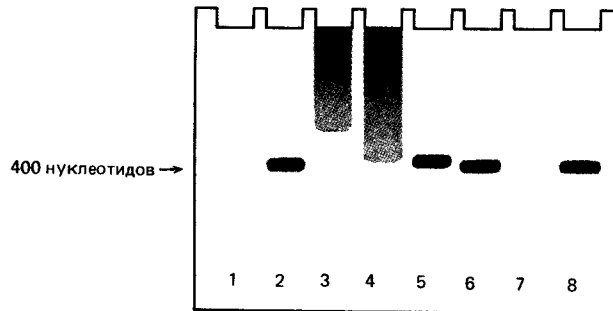
Рис. 9-21. Строение тест-плазмид (А) и результаты определения транскрипции при разных условиях (Б) (задача 9-25). Во все реакционные смеси добавляли РНК-полимеразу II, факторы транскрипции 32 P-СТР. Наличие других компонентов отмечено над каждой дорожкой: (+) означает, что компонент присутствует в реакционной смеси, (-) означает, что компонент отсутствует.

А. ТЕСТ-ПЛАЗМИДЫ



Б. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ IN VITRO

Плазмида	C	ML	C	ML	C	ML	C	ML
GTP	-	-	+	+	+	+	+	+
РНКазы T1	-	-	-	-	+	+	+	+
3'-O-метил-GTP	-	-	-	-	-	-	+	+



крипции (см. задачу 9-25), вы устанавливаете, что транскрипция нарастает линейно в течение часа и затем выходит на плато. Объем реакционной смеси при определении составляет 25 мкл, и в ней присутствуют ДНК-матрица в концентрации 16 мкг/мл (плазмида pML1 длиной 3,5 т.п.н.) и другие компоненты в избытке. По специфической активности 32 P-СТР и общей радиоактивности транскриптов вы вычисляете, что к моменту достижения плато включилось 2,4 пмоль СМР. Каждый транскрипт имеет в длину 400 нуклеотидов и суммарный состав C_2A_U . (Масса одной нуклеотидной пары составляет 660 дальтон.)

- Сколько транскриптов образуется в ходе реакции?
- Сколько матриц участвует в каждой реакции?
- Сколько транскриптов в расчете на одну матрицу образуется в ходе этой реакции?

9-27 Как упаковка ДНК в хроматине влияет на транскрипцию у эукариот? Вы предполагаете решить эту задачу в лоб, используя не содержащую С транскрипционную единицу (полученную в задаче 9-25). Эта матрица хорошо транскрибируется в присутствии РНК-полимеразы II и четырех факторов транскрипции – TFIIA, TFIIIB, TFIIID и TFIIIE.

Для изучения влияния хроматина на транскрипцию вы сначала упаковываете матрицу в нуклеосомы (используя экстракт из ооцитов лягушки), выделяете хроматиновую матрицу и затем добавляете компоненты, необходимые для транскрипции. Транскрипция не идет (рис. 9-22, дорожка 2). Тогда вы пытаетесь проделать все это в ином порядке. Сначала вы инкубируете матрицу с компонентами, необходимыми для транскрипции, но в отсутствие нуклео-

Рис. 9-22. Влияние сборки хроматина на транскрипцию (задача 9-27). Матрицы для транскрипции предынкубировали в разных условиях: в отсутствие всех компонентов, добавив все, кроме какого-либо одного компонента (например, —А означает, что отсутствует TFIIA, и —II означает, что отсутствует РНК-полимераза II); в присутствии всех компонентов. Определение транскрипции проводили в присутствии всех или всех за исключением одного компонентов транскрипции.

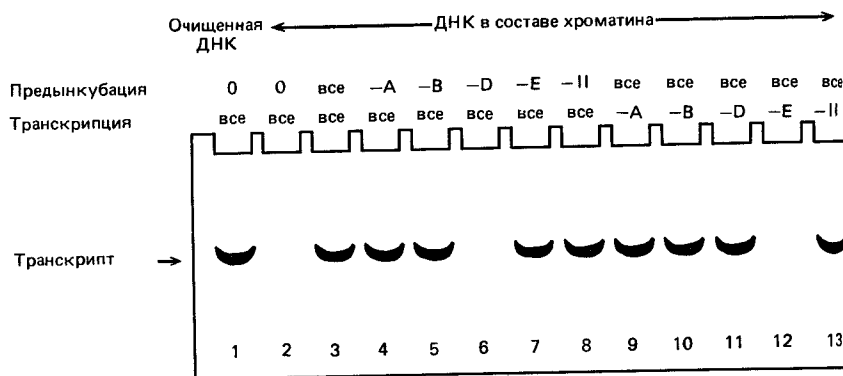


Рис. 9-23. Транскрипционная единица (А) и чувствительность к ультрафиолету транскрипционной единицы (Б) (задача 9-28). Положение транскрипционной единицы относительно промотора (левый конец) в зависимости от концентрации ультрафиолетового излучения (дот-гибридизация).

зидтрифосфатов (NTP), затем упаковываете матрицу в нуклеосомы и выделяете хроматиновую матрицу. Когда вы теперь добавляете компоненты, необходимые для транскрипции (в присутствии NTP), транскрипция идет так хорошо, как будто вы проводите ее с очищенной ДНК (дорожки 1 и 3). Отсюда вы делаете вывод, что с матрицей должны связаться один или более компонентов транскрипции, которые и обеспечивают доступ к промотору.

Для более подробного анализа этого явления вы проводите два дополнительных опыта. В ходе одного из них вы не добавляете отдельные компоненты, необходимые для транскрипции, в течение предварительной инкубации (дорожки 4–8). Во втором опыте вы не добавляете отдельные компоненты, необходимые для транскрипции, в ходе самой транскрипции (дорожки 9–13).

- Какой из компонентов, необходимых для транскрипции, должен присутствовать во время предварительной инкубации, чтобы матрица сохраняла свою активность при сборке хроматина?
- Какой из компонентов, необходимых для транскрипции, образует с матрицей комплекс, оказывающийся устойчивым при сборке хроматина и последующей очистке?
- Какой из компонентов, необходимых для транскрипции, следует добавить в ходе реакции, чтобы получить транскрипт?

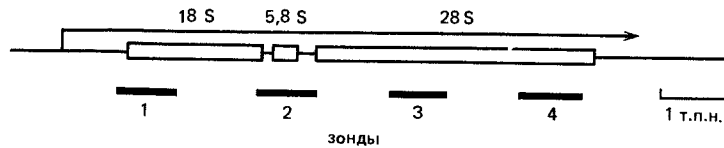
9-28 Трипаносома — микроорганизм, вызывающий сонную болезнь, может изменять состав своей гликопротеиновой оболочки и таким образом защищаться от иммунного ответа хозяина. Вы изучаете синтез варибельного гликопротеина оболочки (VSG — variable surface glycoprotein) и уже картировали ген, кодирующий этот белок и расположенный вблизи теломеры одной из хромосом. Однако вам не удалось локализовать промотор. Из ваших данных следует, что его может отделять от гена VSG много тысяч нуклеотидов.

Ваш друг уже давно предлагал использовать для картирования промотора облучение ультрафиолетом — метод, который уже хорошо зарекомендовал себя при картировании транскрипционных единиц аденовируса. РНК-полимераза не может продолжать транскрипцию через пиримидиновые димеры, возникающие в результате облучения ультрафиолетом, поэтому чувствительность транскрипции к облучению ультрафиолетом можно использовать как меру расстояния между началом транскрипции и той точкой, в которой вы определяете транскрипцию. Потерпев неудачу с другими методами, вы решаете испробовать этот подход.

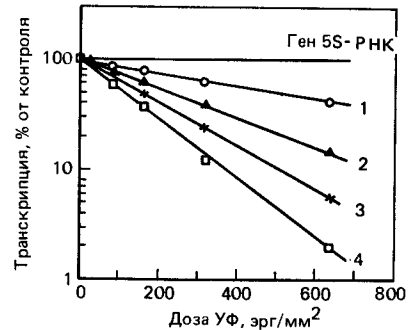
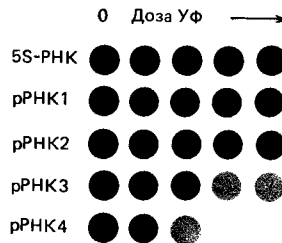
Для калибровки системы вы определяете транскрипцию генов рибосомной РНК. Транскрипционная единица 5S-рРНК содержит

Рис. 9-23. Строение транскрипционной единицы рибосомной РНК (А) и чувствительность к ультрафиолету транскрипционных единиц 5S-РНК и других рибосомных РНК (Б) (задача 9-28). А. Указано расположение гибридационных зондов относительно промотора (левый конец стрелки) в транскрипционной единице. Б. Транскрипция в зависимости от дозы облучения ультрафиолетом, выявленная при дот-гибридизации (слева) и представленная в виде графика (справа).

А. ТРАНСКРИПЦИОННАЯ КАРТА



Б. РЕАКЦИЯ НА ДОЗУ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ



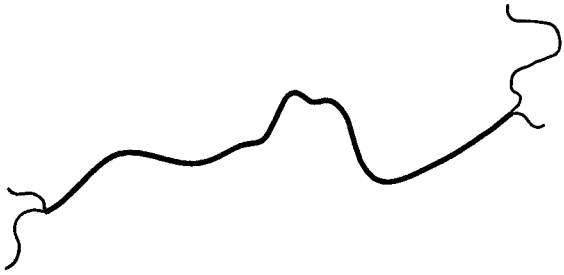
немногим более 100 нуклеотидов, тогда как гены 18S-, 5,8S- и 28S-рРНК составляют часть одной транскрипционной единицы длиной 8 т.п.н. (рис. 9-23, А). Вы облучаете трипаносом ультрафиолетом в возрастающих дозах, выделяете ядра и инкубируете их с ^{32}P -dNTP. Затем выделяете из ядер РНК и гибридуете ее с клонированной ДНК, кодирующей ген 5S-РНК и различные фрагменты транскрипционной единицы рибосомной РНК (рис. 9-23, Б). Если на графике откладывать логарифм значения радиоактивности в зависимости от дозы ультрафиолетового облучения, то получится прямая линия (рис. 9-23, Б). Угол наклона такой линии пропорционален расстоянию от промотора до области гибридизации зонда.

Если вы повторите этот эксперимент с зондом, комплементарным началу гена VSG, то обнаружите, что транскрипция инактивируется примерно в 7 раз быстрее, чем в случае зонда 4 транскрипционной единицы рибосомной РНК.

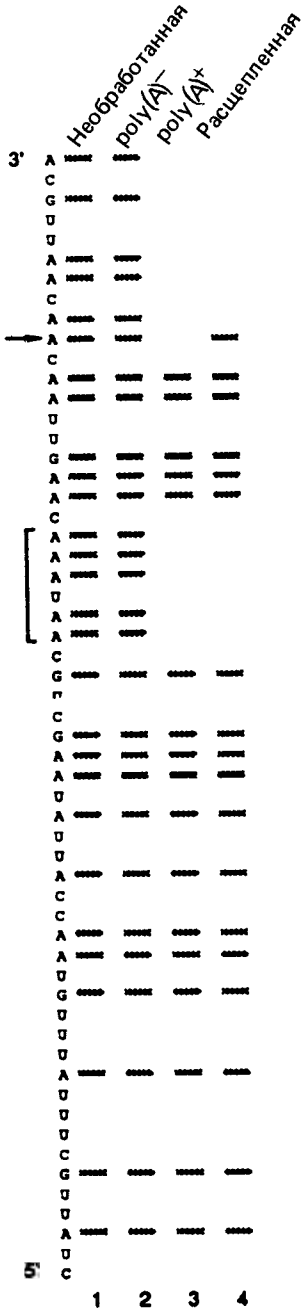
- Почему чувствительность транскрипции РНК к ультрафиолетовому облучению увеличивается по мере увеличения расстояния от промотора?
- Сделайте приблизительную оценку того, на каком расстоянии находится ген VSG от своего промотора. Какое допущение следует сделать, чтобы определить это расстояние?
- Вы обнаружили другой ген, расположенный перед геном VSG на расстоянии примерно 10 т.п.н. Транскрипция этого гена приблизительно на 20% менее чувствительна к инактивации ультрафиолетом, чем транскрипция гена VSG. Могут ли эти гены транскрибироваться с одного промотора?

9-29 Вы изучаете ДНК-содержащий вирус, который на поздних стадиях инфекции синтезирует ряд белков в больших количествах. мРНК для одного из этих белков соответствует рестрику из середины линейного генома. Чтобы точно определить локализацию этого фрагмента, вы гибридуете мРНК с очищенными рестриками в условиях, когда стабильными оказываются только дуплексы ДНК-РНК, а цепи ДНК не спариваются. При изучении дуплексов,

Рис. 9-24. Гибрид ДНК-РНК между мРНК и рестрикционным фрагментом аденовируса (задача 9-29).



образовавшихся в ходе гибридизации, вы видите с помощью электронного микроскопа структуры, подобные представленной на рис. 9-24. Почему на концах гибридов ДНК-РНК наблюдаются одноцепочечные «хвосты»?



9-30 3'-Концы эукариотических мРНК в большинстве случаев определяют путем расщепления РНК-предшественника и последующего присоединения poly(A)-хвоста длиной от 200 до 300 нуклеотидов. Главным сигналом для полиаденилирования служит последовательность AAUAAA, расположенная непосредственно на 5'-конце сайта полиаденилирования. Значение этого сигнала определяли разными способами. Один элегантный подход заключался в использовании химической модификации, которая препятствует специфическому взаимодействию с белком. Этот метод состоит в том, что РНК, содержащую сигнальную последовательность, обрабатывают диэтилпирокарбонатом, который взаимодействует с А и G с образованием карбоксиэтилированных производных. Такая обработка делает модифицированные сайты крайне чувствительными к разрушению анилином в соответствующих условиях. Если исходные молекулы РНК пометить с одного конца и обработать так, чтобы в среднем на одну молекулу РНК приходилась одна модификация, то при расщеплении анилином образуется серия фрагментов, длина которых будет соответствовать расположению А и G в РНК (рис. 9-25, дорожка 1). (Этот метод полностью аналогичен методу определения последовательности нуклеотидов ДНК.)

Для определения искомых остатков А и G модифицированные, но еще целые молекулы РНК инкубируют с экстрактом, обеспечивающим расщепление и полиаденилирование. Молекулы РНК затем разделяют на poly(A)⁺- и poly(A)⁻-РНК, обрабатывают анилином и фрагменты анализируют в геле (дорожки 2 и 3). Во второй пробе к экстракту добавляют ЭДТА, что препятствует полиаденилированию, но не влияет на расщепление. Расщепленные молекулы затем выделяют, обрабатывают анилином и также наносят на гель (дорожка 4).

Рис. 9-25. Радиоавтографическое определение пуринов, важных для расщепления и полиаденилирования (задача 9-30). Последовательность РНК-предшественника указана слева, причем 5'-конец расположен внизу, а 3'-конец – вверху. Все молекулы РНК были модифицированы в реакции с диэтилпирокарбонатом. Дорожка 1 – РНК, не обработанная экстрактом (Необработанная). Дорожка 2 – РНК, обработанная экстрактом, но не полиаденилированная [poly(A)⁻]. Дорожка 3 – полиаденилированная РНК [poly(A)⁺]. Дорожка 4 – расщепленная, но не полиаденилированная РНК (Расщепленная).

Рис. 9-26. нуклеоти предшест нуклеоти (задача 9-31). ности ин способн предшестуру, по Участок кальной участо и (Б). В. терный обознач

- А. Какие концы исходных молекул РНК были помечены?
 Б. Объясните, почему полосы, соответствующие сигналу AAUAAA (отмечены на рис. 9-25 квадратной скобкой), отсутствуют в случае poly(A)⁺-РНК и расщепленной РНК?
 В. Объясните, почему полоса, помеченная стрелкой [нуклеотид, к которому в норме добавляется poly(A)⁺], отсутствует в случае poly(A)⁺-РНК и присутствует в случае расщепленной РНК.
 Г. Какие нуклеотиды А и Г важны для расщепления и какие для полиаденилирования?
 Д. Какую информацию можно получить, пометив молекулы РНК с другого конца?

9-31 В отличие от большинства информационных РНК гистоновые мРНК не содержат poly(A) на своих 3'-концах. Вместо этого они содержат другие дополнительные нуклеотиды за счет того, что отщепляются от своего длинного предшественника на несколько нуклеотидов ближе к 3'-концу шпильчатой структуры. Кроме того, правильный процессинг предшественника гистоновой мРНК зависит от консервативной последовательности, расположенной непосредственно за участком расщепления. Судя по данным, полученным на морских ежах, эта консервативная последовательность взаимодействует с РНК, входящей в состав U7-мяРНП.

Вы изучаете процессинг гистоновых мРНК в клетках млекопитающих и хотите узнать, зависит ли формирование их 3'-конца от тех же взаимодействий. Как показано на рис. 9-26, А, между 3'-концами гистоновых мРНК морского ежа и человека наблюдается поразительное сходство. Вы показали, что ядерные экстракты клеток человека «правильно» расщепляют меченый синтетический предшественник гистоновой мРНК. Более того, если экстракт предварительно обработан нуклеазой для разрушения в нем РНК, он теряет способность расщеплять добавленный после этого предшественник гистоновой мРНК. Можно восстановить активность обработанного экстракта, добавив к нему частично очищенную фракцию, содержащую мяРНП.

Для более детального изучения процессинга вы синтезируете олигонуклеотиды ДНК, соответствующие области вокруг предполагаемого участка взаимодействия гистоновой предшественника с мяРНП. Один олигонуклеотид содержит консервативную последовательность человека, другой олигонуклеотид — эту же последо-

А. Гистоновая РНК-предшественник

Человек

5' ACCCAAAGGCUCUUUUCAGAGCCACCCAC 3'
 -----> <-----

Морской еж

5' AAACGGGCUCUUUUCAGAGCCACC 3'
 -----> <-----

Б. Олигонуклеотиды ДНК

Человек 5' ACCGAAAGTAGCTGTG 3'
 Мышь 5' CGGAAAGAGCTGTT 3'
 Обобщенная 5' AAAGAAAGAGCTGGT 3'
 последовательность

В. U7-мяРНК человека

5' m3G-NNGUGUUACAGCUCUUUAGAAUUGUCUAGU... 3'

Рис. 9-26. Последовательность нуклеотидов гистоновых РНК-предшественников (А), олигонуклеотиды ДНК (Б) и мяРНК (В) (задача 9-31). А. Последовательности инвертированных повторов, способных образовать в молекуле предшественника шпильчатую структуру, подчеркнуты стрелками. Участок расщепления указан вертикальной стрелкой. Консервативный участок подчеркнут линией на (А) и (Б). В. m3G — триметил-кэп, характерный для U-РНК. Буквой N обозначен неизвестный нуклеотид.

вательность мыши и третий - обобщенную последовательность полученную на основе сравнения всех известных подобных консервативных последовательностей у млекопитающих (рис. 9-26, В). Когда вы предынкубируете эти олигонуклеотиды с экстрактом в присутствии РНКазы Н (она разрезает РНК в гибриде ДНК-РНК), то процессинг предшественника полностью блокируется консервативными последовательностями мыши и обобщенной последовательностью, тогда как олигонуклеотиды, несущие консервативную последовательность человека, не оказывают никакого влияния. Два олигонуклеотида, проявляющие ингибирующее действие, также вызвали исчезновение из экстракта молекул РНК, состоящих из 63 нуклеотидов. Вам удалось выделить эту мРНК и определить последовательность на ее 5'-конце (рис. 9-26, В).

- А. Объясните смысл эксперимента с олигонуклеотидами. Что вы пытались узнать, инкубируя экстракт с олигонуклеотидами ДНК в присутствии РНКазы Н?
- Б. В опыте был использован экстракт из клеток человека, поэтому вас удивило, что олигонуклеотид, содержащий консервативную последовательность человека, не подавлял процессинг, а олигонуклеотиды, содержащие консервативную последовательность мыши и обобщенную последовательность, ингибировали его. Какое объяснение вы можете предложить?

9-32 Вы только что распечатали на компьютере все последовательности ДНК для семейства генов β-глобина и берете эту кипу листов с собой на дачу, чтобы заняться ею в выходные дни. При просмотре распечатки вы обнаруживаете, что забыли указать с каким участком гена имеете дело. Вам известно, что последовательности, представленные на рис. 9-27, расположены на одной границе – экзон/интрон или интрон/экзон, и что эта граница проходит по пунктирной линии. Вы знаете также, что интроны всегда начинаются динуклеотидами GT и заканчиваются AG, но помните, что эти специфические последовательности могут быть расположены *либо* в начале, *либо* в конце интрона (рис. 9-27).

Если вы не сможете определить, с какой стороны от пунктирной линии расположен интрон, вам придется, несмотря на выходные дни, вернуться в город. От отчаяния вы пытаетесь разрешить задачу с эволюционной точки зрения. Вы знаете, что интроны

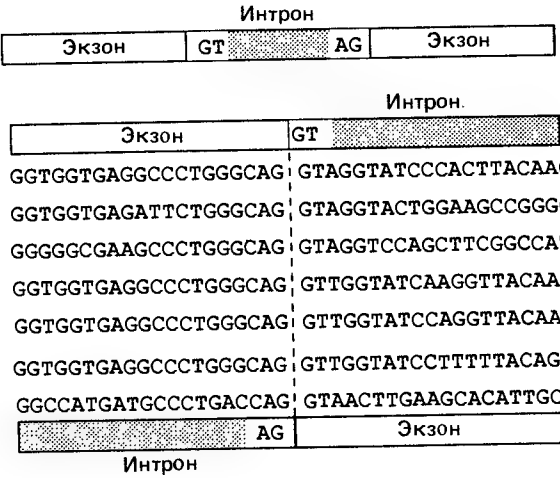
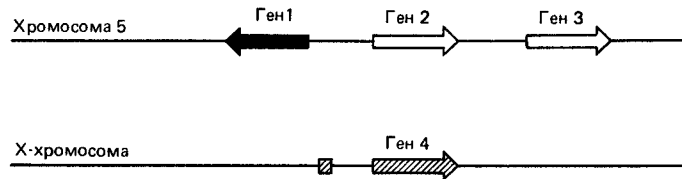


Рис. 9-27. Нуклеотидные последовательности генов β-глобина у разных видов как области экзонов и интронов (задача 9-32).

Рис. 9-28. Ра генов актина (рис. 9-33). Гены указывающ транскрипции

Рис. 9-29. S1-картирование затравки (5'-концов (рис. 9-33).

Рис. 9-28. Расположение четырех генов актина у нематоды (задача 9-33). Гены обозначены стрелками, указывающими направление их транскрипции.



меняются быстрее (в них чаще происходят нуклеотидные замены), чем экзоны, так как изменения последовательностей интронов не затрагивают функцию. Поможет ли такой подход идентифицировать интрон или вам придется собраться в дорогу?

9-33 Вы изучаете контроль на уровне транскрипции при синтезе актина у нематод. У этих животных актиновую мРНК кодируют четыре гена: три из них расположены рядом на хромосоме 5 (последовательности генов 1 и 3 идентичны), и еще один локализован на X-хромосоме (рис. 9-28). Для определения точки начала транскрипции вы используете два подхода: S1-картирование и удлинение затравки (рис. 9-29).

Для определения 5'-конца методом S1-картирования вы гибридизуете радиоактивный одноцепочечный сегмент, расположенный на 5'-конце гена, с соответствующей мРНК, затем обрабатываете гибрид нуклеазой S1, чтобы удалить все одноцепочечные участки и анализируете защищенный фрагмент радиоактивной ДНК с помощью электрофореза в денатурирующем геле, чтобы определить его длину (рис. 9-29, А). При использовании метода удлинения затравки вы гибридизуете специфические олигонуклеотиды по отдельности с каждой из мРНК (гены 1 и 3 идентичны), наращиваете эти олигонуклеотиды до 5'-конца мРНК и анализируете получившиеся фрагменты ДНК в денатурирующем геле (рис. 9-29, Б).

В случае гена 4 результаты, полученные этими двумя методами, совпадают. Однако для генов 1, 2 и 3 длина мРНК, полученная методом удлинения затравки, оказывается на 20 нуклеотидов больше. При сравнении последовательностей мРНК (их можно определить методом удлинения затравки) с последовательностями

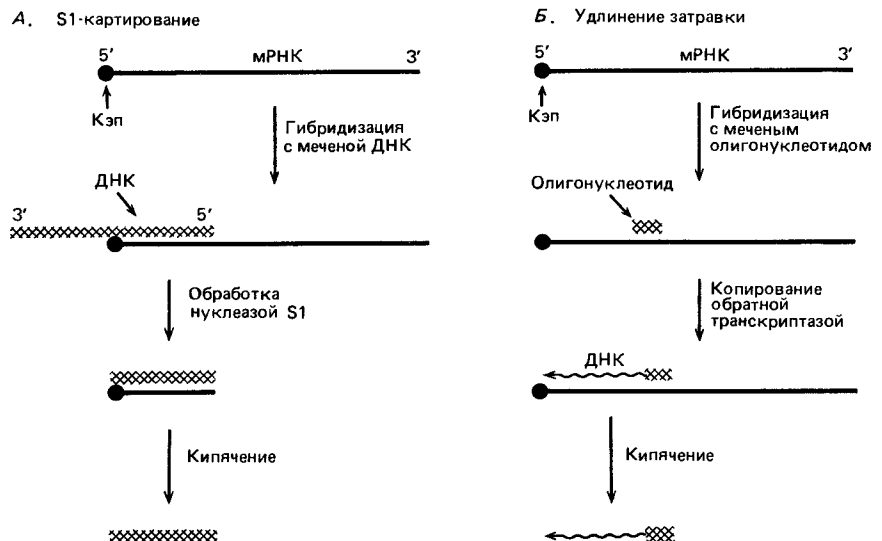
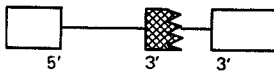


Рис. 9-29. Использование методов S1-картирования (А) и удлинения затравки (Б) для определения 5'-концов актиновых мРНК (задача 9-33).

А. Мини-ген 1



Б. Мини-ген 2

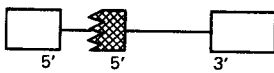


Рис. 9-31. Мини-гены, сконструированные для изучения сканирования интронов при сплайсинге РНК (задача 9-34). Мини-ген 1 (А) содержит два 3'-сайта сплайсинга; мини-ген 2 (Б) содержит два 5'-сайта сплайсинга; прямоугольниками изображены целые экзоны; заштрихованными фигурами — части экзонов. Указаны 5'- и 3'-сайты соединения при сплайсинге.

один с дублированным 5'-сайтом и другой с дублированным 3'-сайтом сплайсинга (рис. 9-31). Вы вводите эти гены в клетки и анализируете образовавшиеся на них РНК, чтобы определить, какой из 5'- и 3'-сайтов отобран при сплайсинге.

- А. Изобразите схематически, какие продукты вы ожидаете получить на каждом из мини-генов, в случае, если осуществляющие сплайсинг структуры связываются с 5'-сайтом сплайсинга и проверяют последовательность в направлении к 3'-сайту сплайсинга, и в случае, если они работают в противоположном направлении.
- Б. При анализе РНК, образуемой с ваших трансфицированных мини-генов, вы обнаруживаете, что на каждом из них синтезируется смесь продуктов. Соединяются ли в результате сканирования интрона соседние экзоны?

Рис. 10-1. Это последовательность ДНК энхансера из вируса SV40, написанная так, чтобы ее можно было читать слева направо, двигаясь к точке начала транскрипции. Указано начало основного транскрипта и подчеркнут кодон ATG, с которого начинается последовательность, кодирующая Т-антиген. Сможете ли вы найти повторы размером 21 п. н. и повторы размером 72 п. н.? Вероятно, в повторах размером 21 п. н. вы сможете найти сайты связывания SPI, но удастся ли вам обнаружить сайты связывания какого-либо из других факторов транскрипции, приведенных в табл. 10-1 в МБК? В работе с рисунком рекомендуем использовать цветные фломастеры.

Энхансер SV40

```

TGCACTTCAATTGCAGCAGCGCCTCTCCAGCAGCAATTTTCAGCTACTGAAAAATCCAGTA
GCAGCAGCAGCTTCAGACACAGTAGCAATTAGGTCCCCAACAGTGTAAAGCAGCACCC
ATGGACCTGAAATAAAAGACAAAAAGACTAACTTACCAGTTAACTTTCTGGTTTTTCAG
TTAACCTTTCTGGTTTTTTTGGTTTTCCCGTCAACAGTATCTTCCCCTTCAAAAATTGCA
GCAAAAGCTCTAAACAAACACAAAAAGGCGTTGAGCTGTTTTTTTACTTTTCAGTCCATG
ACCTACGAACCTTAACGGAGGCCTGGCGTGACAGCCGGCGCAGCACCATGGCCTGAAATA
ACCTCTGAAAGAGGAACTTGGTAGGTACCTTCTGAGGCGGAAAGAACCCAGCTGTGGAAT
GTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGC
ATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGA
AGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCCTAACTCCGCCC
ATCCCGCCCCCTAACTCCGCCCAGTTCGCCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTT
TTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGA
GGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTTGCAAAGATGGATAAAGTTTTAAA
CAGAGAGGAATCTTTGCAGCTAATGGACCTTCTAGGTCTTGAAAGGAGTGCCTGGGGGAA
TATTCCTCTGATGAGAAAGGCATATTTAAAAAATGCAAGGAGTTTCATCCTGATAAAGG
AGGAGATGAAGAAAAAATGAAGA

```

-> Начало транскрипции

Стратегии генетического контроля (МБК 10.1)

10-1 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Регуляция экспрессии генов путем контроля за тем, когда и с какой скоростью осуществляется транскрипция данного гена, называется контролем на уровне _____.
- Б. Регуляция экспрессии генов путем контроля за тем, как идет сплайсинг или иной процессинг первичного транскрипта РНК, называется контролем на уровне _____.
- В. Регуляция экспрессии генов путем отбора в ядре тех зрелых мРНК, которые будут перенесены в цитоплазму, называется контролем на уровне _____.
- Г. Регуляция экспрессии генов путем отбора в цитоплазме тех мРНК, которые будут транслироваться рибосомами, называется контролем на уровне _____.
- Д. Регуляция экспрессии генов путем избирательной дестабилизации определенных молекул мРНК в цитоплазме называется контролем на уровне _____.
- Е. Регуляция экспрессии генов путем избирательных активирования, инактивирования или компартментации определенных молекул белка после их синтеза называется контролем на уровне _____.
- Ж. В клетках эукариот содержится большой набор _____, представляющих собой белки, связывающиеся с ДНК и специфичные к определенной нуклеотидной последовательности; их основная функция состоит во включении и выключении генов.
- З. Стимуляция транскрипции путем связывания белков-регуляторов называется _____, подавление транскрипции путем связывания белков-регуляторов называется _____.
- И. Относительно немногочисленные регуляторные элементы способны обеспечить дифференцировку разнообразных типов клеток за счет _____ генетической регуляции.
- К. Разветвленные сети регуляции генов, где одни белки-регуляторы контролируют гены, кодирующие другие регуляторы генов, координируются _____.
- Л. Белок – регулятор генов, названный _____, который в норме экспрессируется только в миобластах и клетках мышц, при синтезе его в достаточно больших количествах может нарушать нормальный генетический контроль в фибробластах и превращать последние в клетки мышц.

10-2 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие – нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Как правило, изменения в экспрессии генов, лежащие в основе развития многоклеточных организмов, не сопровождаются изме-

- нениями последовательностей ДНК соответствующих генов.
- Б. Сравнение наиболее распространенных белков (порядка 2000) в клетках различных типов, например в клетках печени и легких, показывает, что их содержание по большей части сильно варьирует в зависимости от ткани.
 - В. Хотя экспрессия генов может регулироваться на каждой стадии переноса информации от ДНК к РНК и к белку, все же наиболее распространен контроль на уровне транскрипции.
 - Г. Как только белок-регулятор связывается с узнаваемой им последовательностью ДНК, он стимулирует транскрипцию соседнего гена.
 - Д. Преимущество комбинационной генетической регуляции состоит в том, что огромное разнообразие типов клеток возникает в результате действия относительно небольшого числа белков-регуляторов генов.
 - Е. У эукариот большинство генов регулируется путем связывания всего одного или двух белков-регуляторов.
 - Ж. У дрозофил гомеотические мутации приводят к превращению одной части тела мухи в другую.
 - З. Когда миобласты начинают сливаться, скорость синтеза белков специфических для мышечных клеток, возрастает более чем в 50 раз, меняется также и скорость синтеза многих других белков. По-видимому, все эти события происходят в ответ на появление единственного белка-регулятора, который называется myoD1.

10-3 Ген, кодирующий легкую к-цепь иммуноглобулинов, содержится в одном из своих интронов последовательность ДНК (энхансер), которая регулирует экспрессию этого гена. В ядерных экстрактах В-клеток, активно синтезирующих иммуноглобулины, обнаруживается белок, называемый NF-κB, который связывается с этим энхансером. И напротив, в предшественниках В-клеток (пре-В-клетки), не экспрессирующих иммуноглобулины, белок NF-κB отсутствует. Вас интересует, как белок NF-κB регулирует экспрессию генов, кодирующих легкую к-цепь.

Если пре-В-клетки обработать форболовым эфиром, активным протеинкиназой С, которая фосфорилирует некоторые белки клетки, то через несколько минут появляется активность NF-κB и одновременно активируется транскрипция гена легкой к-цепи. Такая активация NF-κB не тормозится циклогексимидом — ингибитором синтеза белка.

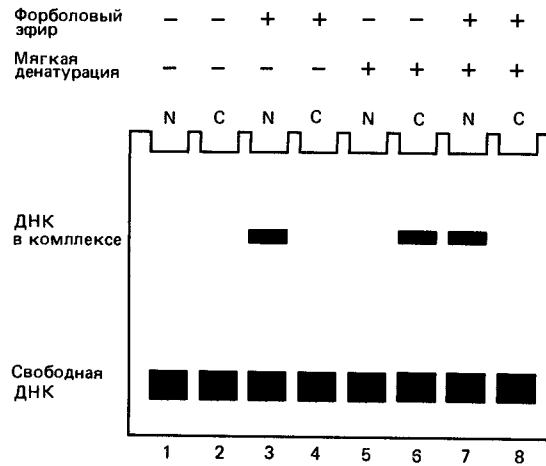
Случайно вы обнаружили, что цитоплазматические экстракты нестимулированных пре-В-клеток содержат неактивную форму NF-κB, которую можно активировать путем обработки мягкими денатурирующими агентами (эти вещества разрушают нековалентные связи, но не затрагивают ковалентные). Для изучения взаимосвязи между активацией NF-κB и регуляцией транскрипции генов легкой к-цепи вы выделяете из пре-В-клеток ядерную (N) и цитоплазматическую (C) фракции как до, так и после стимуляции форболовым эфиром. Затем вы определяете активность NF-κB методом торможения ДНК в геле до и после обработки мягкими денатурирующими агентами. Результаты приведены на рис. 10-1.

- А. Как меняется внутриклеточная локализация NF-κB в пре-В-клетках в ответ на обработку форболовым эфиром?
- Б. Как вы полагаете, является ли активация NF-κB в ответ на обработку форболовым эфиром следствием фосфорилирования NF-κB протеинкиназой С?
- В. Опишите молекулярный механизм активации NF-κB при обработке форболовым эфиром.

Рис. 10-
тормож
NF-κB
10-3). N
и цитоп
соответ
рующи
мида (2
натрия

Рис. 1
боли:
(зада

Рис. 10-1. Определение методом торможения в геле активности NF-κB при разных условиях (задача 10-3). N и C обозначают ядерную и цитоплазматическую фракции соответственно. Мягко денатурирующие вещества—смесь формамида (27%) и дезоксихолата натрия (0,2%).



10-4 В отсутствие глюкозы *E. coli* может расти на арабинозе (пентоза), используя набор индуцибельных генов, расположенных на хромосоме тремя группами (рис. 10-2). В одном из таких сайтов гены *araA*, *araB* и *araD* кодируют ферменты, участвующие в метаболизме арабинозы, тогда как ген *araC* кодирует белок-регулятор, связывающийся неподалеку от просмотра арабинозных генов и координирующий экспрессию генов, входящих в арабинозный оперон. Две другие группы генов кодируют белки, участвующие в транспорте арабинозы.

Для изучения регуляторных свойств белка *araC* вы получаете мутантную бактерию, у которой ген *araC* делегирован. Как показано в табл. 10-1, мутантный штамм при добавлении в среду арабинозы не экспрессирует продукт гена *araA*.

Таблица 10-1. Реакция мутантных бактерий и бактерий дикого типа на присутствие арабинозы в среде (задача 10-4)

Генотип	Продукт гена <i>araA</i>	
	В отсутствие арабинозы	В присутствии арабинозы
<i>araC</i> ⁺	1	1000
<i>araC</i> ⁻	1	1



Рис. 10-2. Локализация генов метаболизма арабинозы в хромосоме (задача 10-4).

- Можно ли по данным табл. 10-1 судить о том, негативную или позитивную регуляцию арабинозного оперона осуществляет белок *araC*?
- Как выглядели бы цифры в табл. 10-1, если бы белок осуществлял регуляцию противоположного типа?

10-5 Клеточная линия эмбриональных фибробластов мыши 10T1/2 (10 T с половиной) представляет собой весьма стабильную линию, клетки которой проявляют свойства фибробластов. Однако если клетки этой линии инкубировать в течение 24 ч в среде, содержащей 5-азацитидин (5-аза-С), то при высокой плотности культуры они начнут дифференцироваться в клетки хряща, жировые или мышечные клетки. (Обработка 5-аза-С снижает общий уровень

метилирования ДНК, что способствует активации ранее неактивных генов.) Если после обработки клетки растут в условиях низкой плотности культуры, то они вначале сохраняют свои исходные свойства фибробластов, но все же дифференцируются позже, когда проходит много поколений и культура достигает высокой плотности. Клетки 10T1/2, не обработанные 5-аза-С, не дифференцируются, какой бы ни была плотность культуры.

При дифференцировке обработанных клеток около 25% из них превращаются в мышечные клетки (миобласты). Высокая частота образования миобластов наталкивает вашего руководителя на мысль, что всю трансформацию может запускать единственный главный ген-регулятор, который в норме находится в репрессированном состоянии вследствие метилирования. Чтобы это проверить, руководитель уговаривает вас провести дорогостоящую поисковую работу: проклонировать этот ген! Вы предполагаете, что ген до обработки 5-аза-С находится в выключенном состоянии и включается лишь в индуцированных миобластах. Если это предположение правильно, то среди кДНК-копий с мРНК, синтезируемых после обработки 5-аза-С, должны обнаружиться последовательности, соответствующие этому гену.

Вам необходимо проверить имеющуюся библиотеку кДНК для нормальных миобластов (которые в соответствии с вашим предположением также будут экспрессировать этот ген), используя набор радиоактивных зондов для идентификации искомым клоном кДНК. Вы готовите три радиоактивных зонда.

- Зонд 1. Вы выделяете РНК из миобластов, индуцированных 5-аза-С, и готовите радиоактивные кДНК-копии.
- Зонд 2. Вы гибридизуете радиоактивную кДНК для индуцированных миобластов с РНК из необработанных клеток 10T1/2 и удаляете все гибриды ДНК-РНК.
- Зонд 3. Вы выделяете РНК из нормальных миобластов и готовите радиоактивно меченые кДНК-копии, которые затем гибридизуете с РНК из необработанных клеток 10T1/2, после чего удаляете гибриды РНК-ДНК.

Первый зонд гибридизуется со многими клонами из библиотеки кДНК, но лишь около 1% из этих клонов гибридизуется с зондами 2 и 3. Всего вы обнаруживаете четыре различных типа гибридизации (табл. 10-2).

Таблица 10-2. Гибридизация кДНК-копий РНК миобластов с радиоактивно меченными зондами (задача 10-5)

Класс	Зонд 1	Зонд 2	Зонд 3
A	+	—	—
B	+	—	+
C	+	+	—
D	+	+	+

- А. Для чего проводилась гибридизация меченой кДНК для двух типов миобластов с РНК из необработанных клеток 10T1/2? Иными словами, зачем нужны зонды 2 и 3?
- Б. Какие общие гены вы ожидаете обнаружить в каждом из четырех классов кДНК-клонов (А, В, С и D в табл. 10-2)? Какой класс кДНК-клонов вероятнее всего содержит последовательности, соответствующие искомому гипотетическому гену-регулятору?

Контроль инициации транскрипции (МБК 10.2)

10-6 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Для того чтобы начать транскрипцию, РНК-полимераза связывается с _____.
 - Б. Белок — _____ подавляет транскрипцию *lac*-оперона, связываясь с определенной последовательностью ДНК, называемой оператором, которая перекрывается с промотором.
 - В. При связывании белка — _____ с определенной последовательностью ДНК ген выключается. Такой тип регуляции называется _____.
 - Г. При _____ контроле белок — _____ связывается с определенной последовательностью ДНК, что способствует транскрипции близлежащего гена.
 - Д. Белок — _____ дает возможность клеткам *E. coli* использовать альтернативные источники углерода в том случае, когда отсутствует его предпочтительный источник — глюкоза.
 - Е. _____ — это одна из пяти основных полипептидных цепей РНК-полимеразы, которая функционирует при инициации и отделяется от ДНК, как только полимеразы начинает синтез РНК.
 - Ж. _____, связывающийся с обобщенной последовательностью ТАТААА, обычно остается в стабильном _____, который может участвовать многократно в циклах транскрипции, осуществляемой молекулами РНК-полимеразы II.
3. Необходимый для транскрипции генов участок ДНК длиной примерно 100 нуклеотидных пар, расположенный перед сайтом инициации синтеза РНК, называется _____.
- И. _____ активен как в прямой, так и в обратной ориентации; его активность проявляется даже при удалении на расстояние более чем 1000 п. н. от промотора, и он способен активировать транскрипцию, находясь как перед геном, так и позади него.

10-7 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Аллолактоза, образуемая клеткой в присутствии лактозы, снимает репрессию с лактозного оперона, связываясь с оператором и стимулирует транскрипцию.
- Б. У бактерий белок-активатор связывается с определенными последовательностями ДНК, которые расположены таким образом, что активатор может входить в контакт с РНК-полимеразой и тем самым повышать вероятность инициации транскрипции.
- В. В активации генов, связанных с метаболизмом азота, участвуют белок *ntnC*, который включает гены лишь тогда, когда находится в фосфорилированной форме, а также фермент, белок *ntnB*, который может как фосфорилировать, так и дефосфорилировать белок *ntnC*.
- Г. В то время как в клетках эукариот регуляция белками-активаторами, которые воздействуют на транскрипцию из удаленных от гена регуляторных сайтов, является наиболее распространенным способом регуляции, у прокариот подобный тип контроля до сих пор не обнаружен.
- Д. Сигма-факторы связываются с РНК-полимеразой, но не взаимодействуют со специфическими последовательностями ДНК. Белок-активатор связывается со специфическими последовательностями ДНК, но не взаимодействует с РНК-полимеразой.
- Е. Бактериальная РНК-полимераза узнает последовательность ДНК, а эукариотическая РНК-полимераза обычно узнает комплекс

- ДНК-белок, образованный основными факторами транскрипции
- Ж. Методы рекомбинантных ДНК в совокупности с анализом *in vitro* дают возможность идентифицировать регуляторные области эукариотических генов, даже если неизвестно, какие белки-регуляторы с ними связываются.
 - 3. Обычно энхансеры высокоактивны во всех типах клеток, но лучше всего они работают в клетках, экспрессирующих ген, с которым энхансеры в норме ассоциированы.
 - И. Если у белка-рецептора глюкокортикоида ДНК-связывающий домен заменить на ДНК-связывающий домен белка-рецептора эстрогена, то гибридный белок-регулятор будет активировать в ответ на глюкокортикоид гены, зависимые от эстрогена.
 - К. У эукариот белки-регуляторы почти всегда активируются или инактивируются в результате связывания с небольшими сигнальными молекулами.
 - Л. Если в белке-регуляторе домен, активирующий транскрипцию, заменить на участок, всего лишь обогащенный кислыми аминокислотами, то можно получить заметную активацию генов как у дрожжей, так и у млекопитающих.

10-8 Клетки *E. coli* растут на моносахариде глюкозе быстрее, чем на дисахариде лактозе, по двум причинам: 1) лактоза поглощается медленнее, чем глюкоза, и 2) для того чтобы лактоза использовалась клетками, она должна быть сначала гидролизована β -галактозидазой до глюкозы и галактозы.

Если *E. coli* выращивать на среде, содержащей одновременно глюкозу и лактозу, то кривая роста будет иметь сложную форму (рис. 10-3, квадратики). Вначале бактерия растет с большей скоростью, чем в конце периода роста, а между этими двумя фазами роста наблюдается период задержки, когда рост практически останавливается. Определение концентрации глюкозы и лактозы в среде показывает, что после нескольких циклов деления клеток содержание глюкозы резко снижается (рис. 10-3, кружки), а концентрация лактозы остается высокой почти до конца. Хотя концентрация лактозы остается высокой в течение всего эксперимента, однако ген β -галактозидазы, регулируемый как часть *lac*-оперона, индуцируется только через 100 мин (рис. 10-3, треугольники).

- А. Объясните, почему кривая роста бактерий в этом эксперименте имеет такую форму. Учтите быстрый начальный рост, замедление роста в конце и остановку роста в середине опыта.

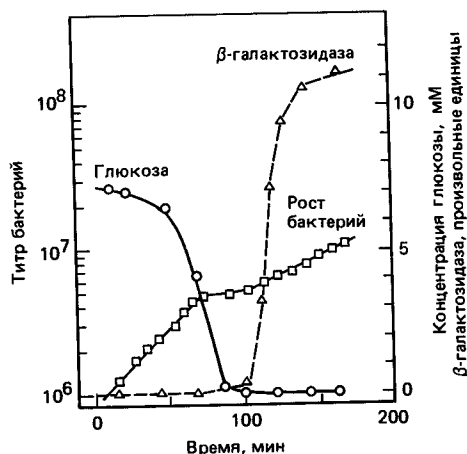


Рис. 10-3. Рост *E. coli* на среде с глюкозой и лактозой (задача 10-8).

Рис. 10-4. Регуляция роста бактерий на среде с глутамином и лактозой. Нормальная кривая роста (квадратики) и кривая роста на среде с глутамином и лактозой (треугольники). В среде с глутамином и лактозой рост бактерий останавливается.

Б. Объясните, почему *lac*-оперон не индуцируется лактозой во время короткой начальной фазы роста бактерий.

10-9 Транскрипция бактериального гена, кодирующего фермент глутаминсинтетазу, регулируется в соответствии с доступностью клеточного азота. Ключевым регулятором транскрипции в этом случае является белок *ntrC*, который стимулирует транскрипцию только после того, как будет фосфорилирован. Фосфорилирование белка *ntrC* контролируется белком *ntrB*, который одновременно является протеинкиназой и протеинфосфатазой. Равновесие между киназной и фосфатазной активностями, а следовательно, фосфорилирование белка *ntrC* и транскрипция глутаминсинтетазы определяется другими белками, которые зависят от соотношения α -кетоглутарата и глутамина. (Это соотношение является чувствительным индикатором доступности азота, поскольку для образования глутамина к α -кетоглутарату должны присоединиться два атома азота в виде аммония.)

Транскрипцию гена глутаминсинтетазы можно получить *in vitro*, если к линейной ДНК-матрице, содержащей ген и соответствующие регуляторные элементы, расположенные перед промотором, добавить РНК-полимеразу, специальный сигма-фактор и фосфорилированный белок *ntrC*. Анализ ДНК методом футпринтинга показывает, что белок *ntrC* связывается с пятью сайтами, расположенными перед промотором. Хотя связывание белка *ntrC* лишь незначительно увеличивается при фосфорилировании, транскрипция тем не менее полностью зависит от фосфорилирования. Однако даже в отсутствие белка *ntrC* РНК-полимераза прочно связывается с промотором.

Участие белка *ntrC* в активации транскрипции исследовали далее с использованием трех различных матриц: обычного гена с интактными регуляторными последовательностями, гена с делетированным сайтом связывания *ntrC* и гена, в котором три из пяти участков связывания белка *ntrC* перемещены к 3'-концу (рис. 10-4,

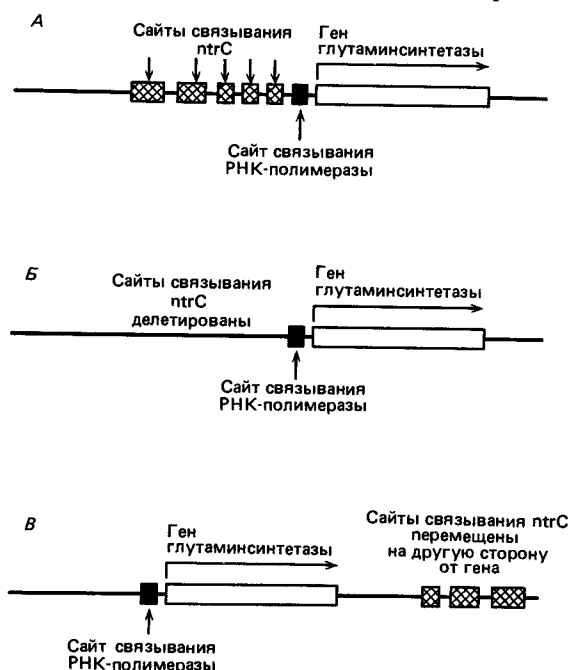
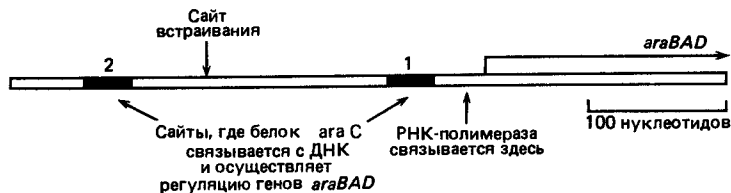


Рис. 10-4. Три матрицы для изучения роли сайтов связывания с белком *ntrC* в транскрипции гена глутаминсинтетазы (задача 10-9). *А.* Нормальный ген с интактными регуляторными последовательностями, расположенными перед промотором. *Б.* Ген, в котором сайты связывания *ntrC* делетированы. *В.* Ген, в котором сайты связывания с белком *ntrC* передвинуты к 3'-концу.

Рис. 10-5. Расположение сайтов связывания с белком *agaC* в опероне *araBAD* (А) и эффект изменения расстояния между сайтами связывания с *araC* (Б) (задача 10-10). Б. Гены *araBAD* замещены геном *galK*, и в сайте встраивания добавлено или делетировано различное число нуклеотидов, как указано на шкале внизу. Колонии клеток, не экспрессирующих галактокиназу, — белые; колонии клеток, образующих галактокиназу, — красные.

А. РЕГУЛЯТОРНАЯ ОБЛАСТЬ *araBAD*



Б. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГАЛАКТОКИНАЗЫ



А, Б и В соответственно). В отсутствие фосфорилированного белка *ntnC* транскрипции на всех этих трех матрицах не наблюдалось. В присутствии 100 нМ фосфорилированного белка *ntnC* транскрипция во всех трех случаях достигала максимального уровня. Однако концентрации белка *ntnC*, необходимые для достижения уровня синтеза, равного половине максимального, для этих трех генов значительно различались: для нормального гена (А) требовалась концентрация 5 нМ, для гена с сайтом связывания на 3'-конце (Б) — 10 нМ, а для гена с делетированным сайтом связывания белка *ntnC* (В) — 50 нМ.

- Если РНК-полимераза может связываться с промотором гена глутаминсинтетазы в отсутствие белка *ntnC*, то почему для активации транскрипции нужен этот белок?
- Если белок *ntnC* может связываться с соответствующими сайтами независимо от того, фосфорилирован он или нет, то почему для транскрипции необходимо фосфорилирование?
- Если белок *ntnC* может активировать транскрипцию даже в отсутствие сайтов его связывания, то зачем нужны эти сайты?

10-10 Механизм регуляции арабинозного оперона у *E. coli* весьма сложен. Кроме того, что соответствующие гены разбросаны по хромосоме тремя группами, белок *agaC*, регулятор этого оперона, может осуществлять как позитивный, так и негативный контроль. Например, при регуляции группы генов *araBAD* (рис. 10-5, А) связывание *agaC* с сайтом 1 в присутствии арабинозы (и в отсутствие глюкозы) повышает уровень транскрипции примерно в 100 раз по сравнению с начальным уровнем, измеренным в отсутствие белка *agaC*. Связывание *agaC* с сайтом 2 в отсутствие арабинозы подавляет транскрипцию генов *araBAD* примерно в 10 раз по сравнению с начальным уровнем, измеренным в отсутствие белка *agaC*. Комбинация эффектов негативного контроля в сайте 2 (в отсутствие арабинозы) и позитивного контроля в сайте 1 (в присутствии арабинозы) приводит к тыся-

чекратному повышению уровня транскрипции генов *araBAD* при добавлении арабинозы.

Механизм позитивной регуляции путем связывания с сайтом 1 представляется достаточно простым, поскольку этот сайт расположен по соседству с промотором, так что присоединение белка-регулятора, вероятно, способствует связыванию РНК-полимеразы или образованию открытого комплекса. Однако вас больше озадачивают результаты связывания с сайтом 2. Сайт 2 расположен за 270 нуклеотидов до сайта начала транскрипции. Регуляторное воздействие на таком расстоянии больше напоминает действие энхансеров в эукариотических клетках. Чтобы облегчить изучение механизма репрессии в сайте 2, вы помещаете всю регуляторную область перед геном *galK*, кодирующим фермент галактокиназу, активность которой определить проще, чем активность ферментов, кодируемых генами *araBAD*.

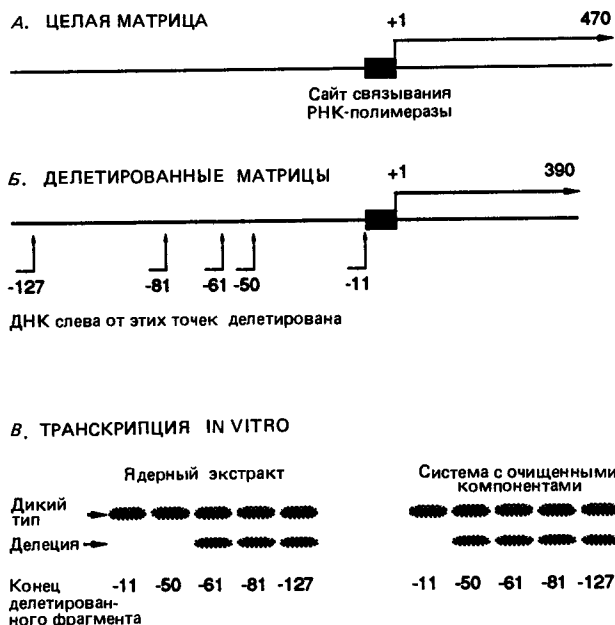
Для изучения того, какую роль играет расстояние, разделяющее два сайта связывания белка *agaC*, вы вставляете или делетируете нуклеотиды в точке встраивания, указанной на рис. 10-5, А. Активность промотора в отсутствие арабинозы можно затем определить по росту бактерий на специальных индикаторных агаровых пластинках, где при полной репрессии промотора образуются колонии белого цвета, а при синтезе галактокиназы – красного. Вы отмечаете цвет колоний против шкалы, на которой отложено количество удаленных или вставленных нуклеотидов (рис. 10-5, Б). К вашему удивлению, белый и красный цвета чередуются.

Когда вы показываете эти результаты вашей руководительнице, она остается очень довольна и говорит вам, что эти эксперименты позволяют определить, какой из трех возможных механизмов репрессии на расстоянии действует в этом случае: 1) изменение в структуре ДНК распространяется от сайта репрессии на область транскрипции, и в результате промотор плохо связывает РНК-полимеразу; 2) белок в сайте репрессии связывается кооперативно (образуя олигомеры), при этом дополнительные субъединицы белка продолжают присоединяться до тех пор, пока растущая цепь из субъединиц не закроет промотор, блокируя транскрипцию; 3) ДНК образует петлю таким образом, что белок, связавшийся с отдаленным сайтом репрессии, будет взаимодействовать с белками (или с ДНК) в точке начала транскрипции.

Какому из этих трех механизмов соответствуют полученные вами результаты и как вы можете объяснить чередование белых и красных полос?

10-11 Вы разработали систему транскрипции *in vitro*, используя определенные сегменты ДНК, транскрибирующиеся под контролем вирусного промотора. Система начинает работать, когда вы добавляете очищенную РНК-полимеразу II, TFIID (белок, связывающийся с ТАТА-боксом), TFIIB и TFIIE (которые связываются с РНК-полимеразой). Однако эффективность транскрипции в этой системе *in vitro* низка, поэтому естественно предположить, что могут существовать и дополнительные регуляторные последовательности, связывающие те факторы, которых нет среди очищенных компонентов. Для идентификации последовательностей ДНК, с которыми связываются эти гипотетические факторы регуляции, вы получаете серию делеций перед точкой начала транскрипции (рис. 10-6, Б) и сравниваете активность транскрип-

Рис. 10-6. Транскрипция под контролем вирусного промотора (задача 10-11). **А.** Неделетированная матрица. **Б.** Делетированные матрицы. На неделетированной матрице образуется транскрипт, который на 80 нуклеотидов длиннее, чем транскрипты с матриц, несущих делеции в расположенных выше промотора регуляторных областях. При делециях удаляется участок слева от места, указанного стрелкой. Нуклеотиды пронумерованы от точки начала транскрипции (+1), отрицательными числами обозначены нуклеотиды, расположенные перед точкой начала транскрипции. **В.** Результаты транскрипции смеси делетированных и неделетированных матриц в грубом экстракте (слева) и при использовании очищенных компонентов (справа). Отрицательные числа означают, какую из делетированных матриц включали в смесь.



ции в очищенной системе и в грубых экстрактах. В качестве внутреннего контроля вы смешиваете препарат каждой из делетированных молекул с препаратом целой матрицы, транскрипт с которой имеет несколько большую длину (рис. 10-6, А). Результаты этих определений приведены на рис. 10-6, В. Делеции вплоть до положения -61 не влияют на транскрипцию, а делеции в положении -11 инактивируют транскрипцию как в очищенных системах, так и в экстрактах. Удивительно, что ДНК с делецией в положении -50 транскрибируется так же эффективно, как и неделетированная матрица в очищенной системе, но не в экстрактах.

Вы выделяете белок, ответственный за этот эффект, и показываете, что он стимулирует примерно в 10 раз транскрипцию с неделетированной матрицы и с ДНК, несущей делецию в положении -61, но не стимулирует транскрипцию с матрицы, содержащей делецию в положении -50. Результаты футпринтинга показали, что этот фактор связывается с определенной короткой последовательностью, расположенной перед ТАТА-боксом. Более того, если в отсутствие TFIIID этот фактор связывается со своим сайтом на очень короткое время (время полужизни 20 с), то в присутствии TFIIID он связывается стабильно (время полужизни превышает 5 ч).

- Где находится сайт связывания стимулирующего фактора?
- Почему добавление стимулирующего фактора в присутствии других очищенных компонентов транскрипции вызывает исчезновение транскриптов с матрицы, имеющей делецию в положении -50?
- Как вы полагаете, почему существует такая заметная разница в стабильности связывания этого стимулирующего фактора в присутствии и в отсутствии TFIIID?

10-12 Вы провели клонирование нескольких неполных последовательностей кДНК, кодирующей фактор транскрипции, в экспрессионном векторе, чтобы определить, будут ли соответствующие этим

А. КАРТА

1
2
3
4
5'

Б. ОПРЕДЕЛЕНИЕ

ЗАМЕ

Клон кДНК

1
2
3
4

Рис. 10-7

последовательностей

рующихся

и определены

белков м

(Б). Ради

ловлена

10-12).

Рис. 10-8

делений

тикоидно

10-13). С

рисунка

в рецепте

ДНК и у

кортикои

С-концев

в нижней

ставлены

определе

добавлен

там C¹⁴-у

пятно - эт

вступивш

пятна - пр

одной или

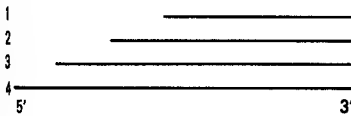
к хлорам

(+) или с

зона указ

щими до

А. КАРТА КЛОНОВ



Б. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАМЕДЛЕНИЯ В ГЕЛЕ

Клон кДНК	1	2	3	4	5	6
1	-	+	-	-	-	-
2	-	-	+	-	-	-
3	-	-	-	+	-	+
4	-	-	-	-	+	+

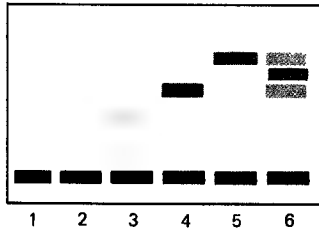


Рис. 10-7. Структура неполных последовательностей кДНК, кодирующих фактор транскрипции, (А) и определение кодируемых ими белков методом торможения в геле (Б). Радиоактивность полос обусловлена меченой ДНК (задача 10-12).

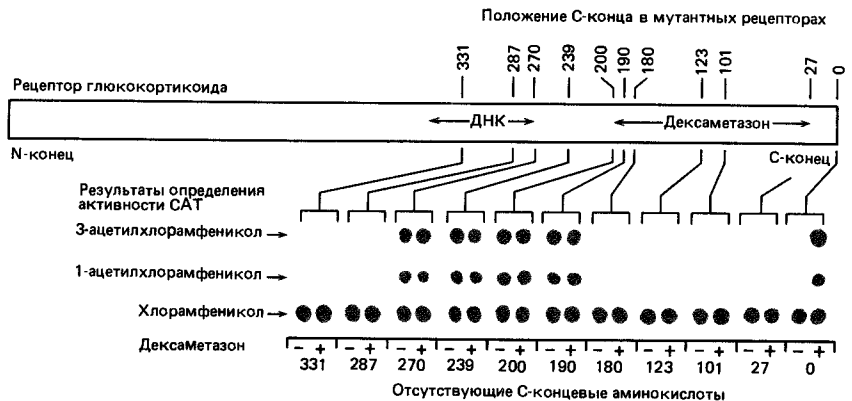
Рис. 10-8. Влияние С-концевых делеций на активность глюкокортикоидного рецептора (задача 10-13). Схема в верхней части рисунка показывает расположение в рецепторе участков связывания ДНК и участков связывания глюкокортикоида, а также локализацию С-концевых делеций. На схеме в нижней части рисунка представлены результаты стандартного определения активности САТ путем добавления к клеточным экстрактам C^{14} -хлорамфеникола. Нижнее пятно — это хлорамфеникол, не вступивший в реакцию, верхние пятна — продукты присоединения одной или двух ацетильных групп к хлорамфениколу. Присутствие (+) или отсутствие (-) дексаметазона указано под соответствующими дорожками.

фрагментам части белка связываться с энхансером, узнаваемым целым фактором транскрипции. Клоны, содержащие неполные последовательности кДНК, укорочены на разные отрезки со стороны 5'-конца гена (рис. 10-7, А). Вы транскрибируете, а затем транслируете эти клоны кДНК *in vitro* и смешиваете продукты трансляции с высокорadioактивной ДНК, несущей энхансер. При анализе этих смесей методом электрофореза в полиакриламидном геле некоторые из белков, кодируемых клонами кДНК, связываются с фрагментом ДНК, вызывая замедление его движения в геле (рис. 10-7, Б, дорожки 3, 4 и 5). Если перед транскрипцией и трансляцией смешать вместе клоны 3 и 4 кДНК, то в геле появятся три полосы (рис. 10-7, Б, дорожка 6).

- Почему запаздывающие полосы находятся в геле на разных уровнях?
- Где в молекуле фактора транскрипции расположен домен, связывающийся с энхансером?
- Почему при смешивании клонов 3 и 4 кДНК в геле появляются три запаздывающие полосы? Какой вывод о структуре фактора транскрипции можно сделать на основе этих данных?

10-13 Когда глюкокортикоидные гормоны присоединяются к рецепторам, последние меняют свою конформацию, приобретая способность связываться с ДНК и активировать определенный набор генов. Результаты генетических и молекулярных исследований говорят о том, что участки связывания с ДНК и участки связывания с гормонами занимают разные области С-концевой части глюкокортикоидного рецептора. Присоединение гормона может способствовать связыванию рецептора с ДНК одним из двух способов: за счет изменения конформации рецептора и образования в результате этого домена, связывающегося с ДНК, либо за счет такого изменения конформации, при котором открывается ранее существовавший ДНК-связывающий домен.

Для анализа этих двух возможностей сопоставляли активность ряда фрагментов с последовательными делециями у карбоксильного конца (рис. 10-8). Фрагменты кДНК, соответствующие N-концевой части рецептора, встраивались в вектор таким образом, что могли экспрессироваться после трансфекции в соответствующие клетки. Способность фрагментов рецептора активировать чувствительные к нему гены проверяли в ходе котрансфекции с индикаторной плазмидой, несущей чувствительный к глюкокортикоиду элемент, соединенный с геном хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT). Как показано на рис. 10-8, реакция



клеток, котрансфицированных кодирующей последовательностью интактного рецептора, была такой, как и ожидалось: в отсутствие глюкокортикоида активность САТ не обнаруживалась, а в присутствии глюкокортикоида (дексаметазона) активность САТ легко выявлялась. Шесть мутантных рецепторов, у которых отсутствовали 27, 101, 123, 180, 287 и 331 аминокислотный остаток на карбоксильном конце, были неспособны стимулировать экспрессию САТ в присутствии или в отсутствие дексаметазона. Напротив, четыре мутантных рецептора, у которых отсутствовали 190, 220, 239 и 270 аминокислотных остатков на карбоксильном конце, активировали экспрессию САТ как в присутствии, так и в отсутствие дексаметазона. В специальных экспериментах было показано, что мутантные и интактные рецепторы синтезировались в равных количествах.

Как данные этих экспериментов могут помочь выбрать одну из предложенных моделей гормон-зависимого превращения нормального рецептора в форму, связывающуюся с ДНК? Что происходит при связывании гормона: образуется сайт связывания с ДНК или же открывается существовавший ранее сайт связывания с ДНК?

Молекулярно-генетические механизмы образования различных типов клеток (МБК 10.3)

- 10-14 Заполните пропуски в следующих утверждениях.
- А. Сайт-специфическая инверсия сегмента ДНК у *Salmonella*, сопровождающаяся сменой типа синтезируемого флагеллина, известна под названием _____.
 - В. У дрожжей диплоидные клетки образуются в ходе процесса _____, при котором происходит слияние двух гаплоидных клеток.
 - В. Образование трех типов клеток у дрожжей — α , a и диплоидных a/α — контролируется главными белками-регуляторами, закодированными в локусе _____.
 - Г. Механизм переключения, от которого зависит, будет ли бактериофаг лямбда размножаться в цитоплазме *E. coli* (приводит к гибели клетки-хозяина) или же он встроится в ДНК клетки-хозяина, контролируется двумя белками-регуляторами генофага лямбда — _____ и _____.
 - Д. Исследования с помощью светового микроскопа, проведенные в 1930-х гг., показали, что существуют области хромосом, называемые _____, которые не деконденсируются в интерфазе, оставаясь в сильно конденсированном состоянии, характерном для метафазных хромосом.
 - Е. У дрозофил хромосомные перестройки, при которых участки из центра гетерохроматиновой области переносятся к ее концу, граничащему с эухроматином, приводят к инактивации близлежащего эухроматинового гена за счет процесса, называемого _____.
 - Ж. Сегмент ДНК, локализованный на расстоянии 50 000 п.н. от кластера глобиновых генов, содержит группу из шести сверхчувствительных к нуклеазе сайтов, которые влияют на весь кластер; эта область называется _____.
 - З. У бактерий, например у *E. coli*, есть фермент ДНК-топоизомеразы типа II, называемая _____; она использует энергию гидролиза АТФ, чтобы непрерывно создавать сверхвитки в ДНК.

и таким образом поддерживать в ней постоянное напряжение.

- И. В ДНК позвоночных содержится _____, который сходен с цитозином так же, как тимин с урацилом и подобно ему при замене не влияет на спаривание оснований.
- К. Последовательности CG встречаются в 10–20 раз чаще, чем обычно, в определенных участках, называемых _____, которые окружают промоторы так называемых генов _____.
- Л. _____ гены кодируют белки, необходимые лишь в клетках определенного типа.

10-15 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Фазовая вариация у *Salmonella* и *N. gonorrhoeae* происходит при инверсии гена.
- Б. Смена типа спаривания у дрожжей происходит необратимо, поскольку при этом исходный ген в локусе MAT, определяющий тип спаривания, удаляется и замещается геном другого типа спаривания.
- В. Два молчащих гена типа спаривания не транскрибируются в месте их локализации, поскольку в них отсутствуют соответствующие элементы промотора.
- Г. Белок-репрессор фага лямбда и сго-белок могут взаимно подавлять синтез друг друга, создавая своего рода молекулярный переключатель на две позиции: он определяет лизогенное состояние в случае преобладания репрессора или литическое состояние в случае преобладания сго-белка.
- Д. У дрозофилы некоторые белки-регуляторы, кодируемые главным геном, стимулируют транскрипцию своего гена. В то же время они подавляют транскрипцию главного гена, экспрессируемого в прилежащей части эмбриона на ранней стадии развития.
- Е. Факультативный гетерохроматин, который локализован вокруг центромеры в каждой митотической хромосоме, находится во всех клетках в конденсированном состоянии. Конститутивный гетерохроматин присутствует в необычно конденсированном виде лишь в некоторых типах интерфазных клеток.
- Ж. Поскольку у самок при образовании клеток зародышевой линии конденсированная X-хромосома вновь активируется, в ее ДНК не может происходить стабильных изменений.
- З. Наследование способа инактивации хромосом в форме гетерохроматина, например инактивации X-хромосомы, вполне можно объяснить механизмами генетического контроля, целиком зависящими от действия диффундирующих белков-регуляторов.
- И. Экспрессия трансгенов часто ограничена теми тканями, в которых данные гены экспрессируются в норме; тем не менее уровень транскрипции обычно в пять–десять раз ниже, чем тот, что наблюдается в ткани, где ген экспрессируется на высоком уровне.
- К. Фенотипические проявления некоторых мутаций заставляют предположить, что активация генов у высших эукариот происходит в две стадии: на первой стадии открывается большой домен хромосомы, на второй стадии активируются элементы, специфически регулирующие ген.
- Л. При расплетании ДНК в одном определенном сайте могут возникать топологические эффекты, которые оказывают влияние на всю хромосому.
- М. Поддерживающая метилаза обеспечивает сохранение ранее существовавшего типа метилирования CG-последовательностей, а устанавливающая метилаза проводит изначальную разметку

- сайтов, метилируя CG-последовательности в яйцеклетках.
- Н. Если клетки в течение короткого периода времени инкубировать в присутствии 5-аза-С, то это основание включается в ДНК, где действует как ингибитор поддерживающей метилазы, снижая таким образом общий уровень метилирования и активируя ранее не экспрессировавшиеся гены.
 - О. CG-островки в промоторных областях генов «домашнего хозяйства» сохранились в ходе эволюции благодаря тому, что сайт-специфические белки, связывающиеся с ДНК, защищают 5-метилцитозин в этих островках от случайного дезаминирования и превращения в Т-нуклеотиды.

10-16 Среди патогенных организмов довольно распространена способность периодически изменять свои поверхностные структуры с целью защиты от иммунного ответа хозяев. Так, бактерии рода *Salmonella* (способные вызывать пищевые отравления) могут существовать в двух формах, различающихся своими антигенными детерминантами, или фазами, как они были названы первооткрывателями в 1922 г. Бактерии, находящиеся в двух разных фазах, синтезируют разные типы флагеллина — белка, образующего жгутик. Бактерии, находящиеся в фазе 1, переключаются на фазу 2 примерно один раз на тысячу делений клетки. С такой же частотой происходит и обратный процесс. Изначально были выдвинуты две гипотезы о механизме переключения: перестройка ДНК, например вставка или инверсия, и модификация ДНК, например метилирование.

Два типа флагеллинов, ответственных за фазовую вариацию, кодируются несцепленными генами *H1* и *H2*, каждый из которых кодирует полностью функциональный флагеллин. Генетический элемент, ответственный за переключение фаз у бактерий, расположен очень близко к гену *H2*. С целью выявить механизм, ответственный за переключение, был проклонирован фрагмент ДНК, содержащий ген *H2*. При введении этого гена в *E. coli*, не имеющую жгутиков, большинство клеток, включивших плазмиду, приобретали подвижность, т.е. синтезировали флагеллин, кодируемый геном *H2*. Однако в немногих колониях *E. coli* клетки были неподвижными несмотря на то, что несли плазмиду. Если из клонов таких неподвижных клеток выделяли ДНК и вводили ее в свежие культуры *E. coli*, то некоторые из трансформированных бактерий приобретали подвижность, т.е. в них начинался синтез флагеллина *H2*.

Из культур, в которых произошло переключение, выделяли ДНК, обрабатывали ее рестриктазой, нагревали, чтобы цепи ДНК разделились (плавление), и затем медленно охлаждали, чтобы цепи ДНК опять соединились (гибридизация). Затем молекулы ДНК изучали с помощью электронной микроскопии. Примерно 5% молекул содержали глазок, образованный двумя равными по длине сегментами одноцепочечной ДНК; глазок находился в одном и том же месте вблизи одного из концов. Две такие молекулы показаны на рис. 10-9.

- А. Когда клетки *Salmonella* переключаются с синтеза флагеллина одного типа на синтез флагеллина другого типа, все клетки сохраняют подвижность. Почему у *E. coli* переключение приводит к замене подвижной формы на неподвижную?
- Б. Объясните, как с помощью этих результатов можно определить, какой механизм ответственен за переключение: перестройка ДНК или модификация ДНК?

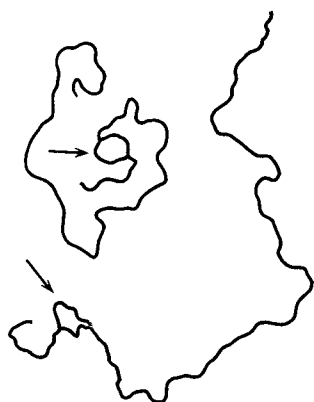


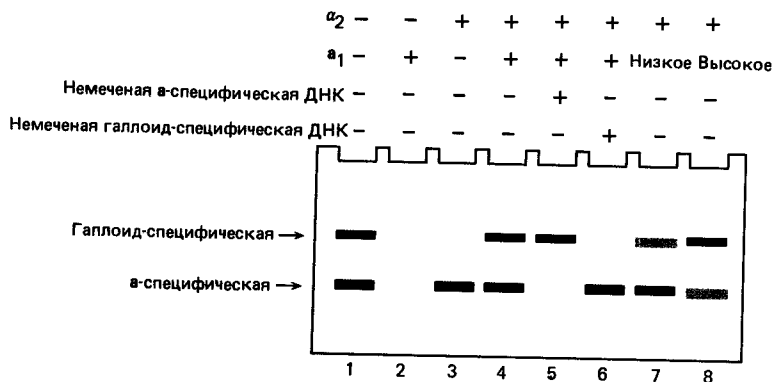
Рис. 10-9. Результат гибридизации фрагментов ДНК из клеток *E. coli*, способных к переключению (задача 10-16). Стрелками указаны одноцепочечные глазки.

Рис. 1
ных б
содер
гапло
ные п
10-17)
ных с
смесь
специ
ченны
ных н
ции п
проти
из эт
Посл
с рен
вызв
ДНК

В. Попробуйте с помощью этих результатов определить, с каким типом перестройки ДНК связано переключение: с делецией, вставкой или инверсией ДНК?

10-17 Один из ключевых регуляторных белков, синтезируемых локусом, ответственным за тип спаривания у дрожжей, это белок-репрессор, обозначаемый α_2 (см. МБК, рис. 10-29). В гаплоидных клетках, относящихся к α -типу спаривания, белок α_2 выключает гены, специфические для типа спаривания α . В диплоидных клетках типа α/α репрессор α_2 действует совместно с продуктом гена α_1 , так чтобы в дополнение к α -специфическим генам выключить набор гаплоид-специфических генов. Двум наборам контролируемых генов в последовательности ДНК предшествуют, как было обнаружено, два разных, но родственных между собой типа консервативных последовательностей ДНК: одна из этих последовательностей расположена перед α -специфическими генами, а другая — перед генами, специфическими для гаплоидных клеток. Поскольку эти последовательности сходны, то репрессор α_2 скорее всего связывается с ними обеими, однако его свойства должны каким-то образом измениться под действием белка α_1 до того, как произойдет узнавание гаплоид-специфической последовательности. Вы хотите понять, за счет чего происходит это изменение. Катализирует ли α_1 ковалентную модификацию α_2 или же α_1 модифицирует α_2 за счет стехиометрического взаимодействия с этим белком?

Для ответа на этот вопрос вы ставите три варианта опыта. Во-первых, измеряете связывание α_1 и α_2 поодиночке и вместе, с двумя регуляторными сайтами ДНК, расположенными перед генами. Как показано на рис. 10-10, сам по себе белок α_1 не связывается с фрагментами ДНК, содержащими один из регуляторных сайтов (дорожка 2), тогда как α_2 связывается с α -специфическими фрагментами, но не с гаплоид-специфическими фрагментами (дорожка 3). В смеси α_1 и α_2 связываются как с α -специфическими, так и с гаплоид-специфическими фрагментами (дорожка 4). Во втором варианте опыта вы вносите в реакционную смесь большой избыток немеченой ДНК, содержащей α -специфическую последовательность, а также смесь белков α_1 и α_2 . В этих условиях гаплоид-специфический фрагмент тоже связывается (рис. 10-10, дорожка 5). Аналогичным образом, если вы вносите в реакционную смесь избыток немеченой гаплоид-специфической ДНК, α -специфический фрагмент все равно связывается (дорожка 6).



В третьем варианте опыта вы варьируете соотношение α_1 и α_2 . Если α_2 присутствует в избытке, то связывание гаплоид-специфического фрагмента уменьшается (рис. 10-10, дорожка 7), если же в избытке α_1 , то снижается связывание с α -специфическим фрагментом (дорожка 8).

- А. Находится ли α_2 в присутствии α_1 в двух формах, различающихся по специфичности связывания, или же в одной форме, которая может связываться с обеими регуляторными последовательностями? Как с помощью ваших результатов сделать выбор между этими двумя возможностями?
- Б. Репрессор α_2 , несущий небольшую делецию в своем ДНК-связывающем домене, не взаимодействует с фрагментами ДНК, содержащими гаплоид-специфическую последовательность. Если, однако, этот мутантный белок экспрессируется в диплоидной клетке одновременно с нормальными белками α_2 и α_1 , то гаплоид-специфические гены включены. (В норме эти гены в диплоидных клетках выключены — см. МБК, рис. 10-29). Что представляется вам более вероятным в свете результатов, полученных в этом и других ваших экспериментах: α_1 катализирует ковалентную модификацию α_2 или же α_1 модифицирует α_2 в результате стехиометрического взаимодействия с этим белком и образования комплекса α_1 - α_2 ?

10-18 Вы обнаружили новый штамм дрожжей, отличающийся по системе спаривания. У дрожжей существуют два типа спаривания гаплоидных клеток, получившие названия М и F. Клетки противоположных типов спаривания могут сливаться с образованием диплоидных клеток М/F. В таких диплоидных клетках могут происходить мейоз и споруляция, но они не могут спариваться друг с другом или с гаплоидными клетками одного из типов спаривания.

Проведенный вами генетический анализ нового штамма показал, что у него имеются четыре гена, контролирующие тип спаривания. Когда в локусе типа спаривания присутствуют гены $M1$ и $M2$, клетки относятся к типу спаривания М. Если же в этом локусе находятся гены $F1$ и $F2$, то клетки относятся к типу спаривания F. Кроме того, вы идентифицировали набор генов, специфически экспрессируемых в гаплоидных клетках М-типа (Msg), набор F-специфических генов (Fsg) и набор генов, специфических для споруляции (Ssg). Получив мутанты, дефектные по каждому из генов типа спаривания (все мутанты жизнеспособны), вы изучаете влияние этих генов на фенотип спаривания и на экспрессию различных наборов экспрессируемых ими специфических генов. Ваши данные для гаплоидных и диплоидных клеток, относящихся к различным комбинациям мутантов, представлены в табл. 10-3.

Предложите схему регуляции продуктами генов $M1$, $M2$, $F1$ и $F2$ экспрессии М-специфических, F-специфических и специфических для споруляции наборов генов. Укажите, какие из продуктов генов являются активаторами или репрессорами транскрипции и как действуют продукты этих генов — по отдельности и/или совместно.

10-19 Вы хотите узнать, остается ли транскрипционный комплекс связанным с ДНК в ходе ее репликации. Если бы связь сохранялась, она могла бы служить своеобразной биологической памятью, позволяющей дочерним клеткам наследовать родитель-

Рис. 10-11. У разному мет 5S-РНК (А) активность н ции и при р 10-19). Макс чен заштрих ный ген — без ками. Буква метилирова к расщеплен обозначена : вость — знако транскрипто ных на нор макси-гене 5 стрелками (

Таблица 10-3. Фенотипы мутантов по типу спаривания у нового штамма дрожжей (задача 10-18)

	Мутант	Фенотип спаривания	Экспрессируемые гены
Гаплоидные клетки	Дикий тип M	M	Msg
	M1 ⁻	Нет спаривания	Msg, Fsg
	M2 ⁻	M	Msg
	M1 ⁻ , M2 ⁻	Нет спаривания	Msg, Fsg
	Дикий тип F	F	Fsg
	F1 ⁻	F	Fsg
	F2 ⁻	Нет спаривания	Fsg, Msg
Диплоидные клетки	F1 ⁻ , F2 ⁻	Нет спаривания	Fsg, Msg
	Дикий тип M, F	Нет спаривания	Ssg
	M1 ⁻ /F1 ⁻	F	Fsg
	M1 ⁻ /F2 ⁻	Нет спаривания	Msg, Fsg, Ssg
	M2 ⁻ /F1 ⁻	Нет спаривания	Нет
	M2 ⁻ /F2 ⁻	M	Msg

Msg – M-специфические гены; Fsg – F-специфические гены; Ssg – гены, специфические для споруляции.

ский тип экспрессии генов. Вы как раз располагаете системой, с помощью которой можно было бы проверить это предположение. Вы можете собрать активный транскрипционный комплекс на гене 5S-РНК из *Xenopus*, встроенном в плазмиду, индуцировать его репликацию и затем проверить транскрипцию реплицировавшихся генов. Все эти стадии вы можете проводить *in vitro*.

Чтобы различить реплицировавшуюся и нереплицировавшуюся матрицы, вы используете преимущества рестриктаз (DpnI, MboI и Sau3A), чувствительных к метилированию своего сайта узнавания GATC (рис. 10-11, А). Эта последовательность в нача-

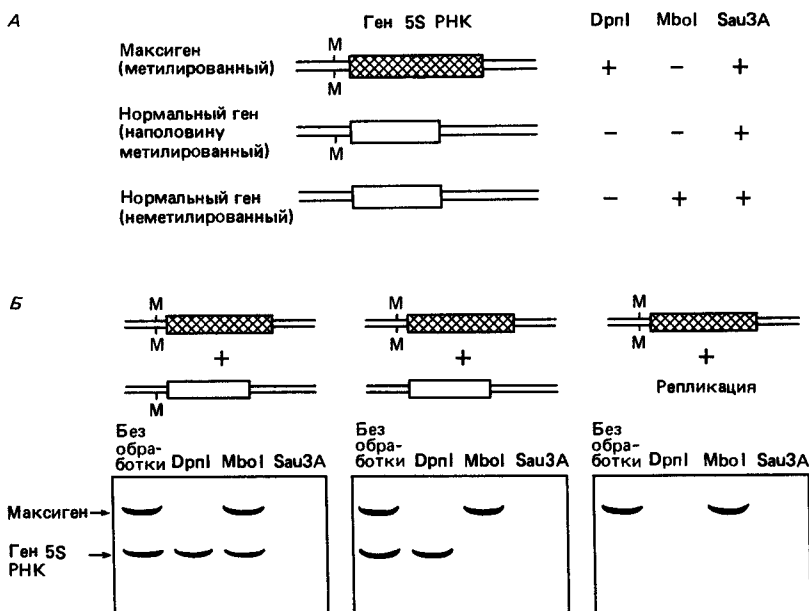


Рис. 10-11. Чувствительность по-разному метилированных генов 5S-РНК (А) и их транскрипционная активность в отсутствие репликации и при репликации (Б) (задача 10-19). Макси-ген 5S-РНК обозначен заштрихованными, а нормальный ген – белыми прямоугольниками. Буква М указывает, что цепь метилирована. Чувствительность к расщеплению рестриктазой обозначена знаком (+), устойчивость – знаком (-). Положение транскриптов РНК, синтезированных на нормальном гене и на макси-гене 5S-РНК, отмечено стрелками (Б).

ле гена 5S-PHK встречается лишь один раз, и если разрезать ДНК по этому сайту, то транскрипция не происходит. Если выращивать матрицу в культуре *E. coli* дикого типа, то последовательность GATC будет метилирована по А в обеих цепях бактериальной *dam*-метилазой. При репликации полностью метилированной ДНК *in vitro* в первом цикле образуются дочерние дуплексы, у которых метилирована только одна цепь (наполовину метилированные), а при последующих репликациях — неметилированные ДНК. Ваша идея заключается в том, чтобы, начав с полностью метилированной ДНК, индуцировать ее репликацию *in vitro*. Затем вы можете определить транскрипцию в реплицировавшейся ДНК, обработав ее *DpnI*, которая разрежет нереплицировавшуюся ДНК (полностью метилированную) и таким образом остановит транскрипцию, но не расщепит реплицировавшуюся ДНК (метилированную наполовину или совсем неметилированную).

Для проверки того, будет ли работать аналитическая часть вашей схемы, вы конструируете ген несколько большего размера, чем нормальный ген 5S-PHK (макси-ген), чьи транскрипты можно отличить от транскриптов нормального гена 5S-PHK (рис. 10-11, А). Затем вы готовите смесь полностью метилированного максигена с наполовину метилированным или неметилированным нормальным геном и определяете их транскрипцию до и после обработки *DpnI*, *MboI* и *Sau3A*. Специфичность рестриктаз приведена на рис. 10-11, А, а результаты экспериментов по транскрипции — на рис. 10-11, Б.

Для определения воздействия репликации на транскрипцию вы собираете транскрипционные комплексы на полностью метилированном макси-гене, индуцируете репликацию и изучаете транскрипционную активность до и после обработки рестриктазами. Результаты приведены на рис. 10-11, Б.

- А. Влияет ли уровень метилирования гена 5S-PHK на транскрипцию? Объясните ваш ответ.
- Б. Совпали ли результаты транскрипции с матриц, обработанных разными рестриктазами, с ожидаемыми? Объясните ваш ответ.
- В. В вашем опыте реплицировалась примерно половина молекул ДНК. Указывает ли характер транскрипции после репликации и расщепления рестриктазами на то, что транскрипционный комплекс остается связанным с геном 5S-PHK в ходе репликации?
- Г. В данных опытах было четко показано, что более 90% молекул образовывали активные транскрипционные комплексы и 50% молекул реплицировались. Как изменились бы ваши данные, если бы только 50% молекул образовывали активные транскрипционные комплексы? Изменились ли бы ваши выводы?

10-20 Вы изучаете значение метилирования ДНК для регуляции экспрессии генов, используя в качестве тест-системы ген γ -глобина человека. Глобиновую мРНК можно обнаружить, когда этот ген встроен в геном фибробластов мыши, хотя и в гораздо меньших количествах, чем в эритроцитах. Если, однако, ген предварительно метилировать по всем 27 сайтам CG, его экспрессия полностью блокируется. Вы используете эту систему для ответа на вопрос о том, достаточно ли одного ключевого сайта метилирования для регуляции экспрессии глобина.

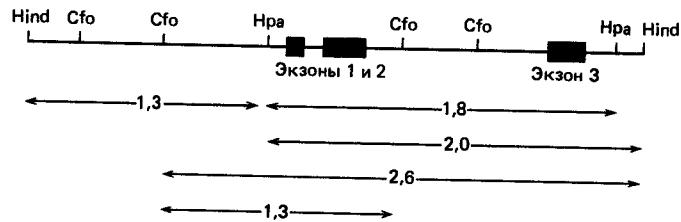
Для получения нескольких отличающихся друг от друга конструкций гена γ -глобина, не метилированных в различных участках, вы используете комбинацию методов сайт-специфи-

Рис. 10-12 на транскрипции (задача 10-20). Указаны рестриктазы, наиболее эффективно выявляемые. Б. Метилирование гена γ -глобина в части генома. Внизу — шесть сайтов мотора. Указаны γ -глобина, приведен процент не содержащих сайтов.

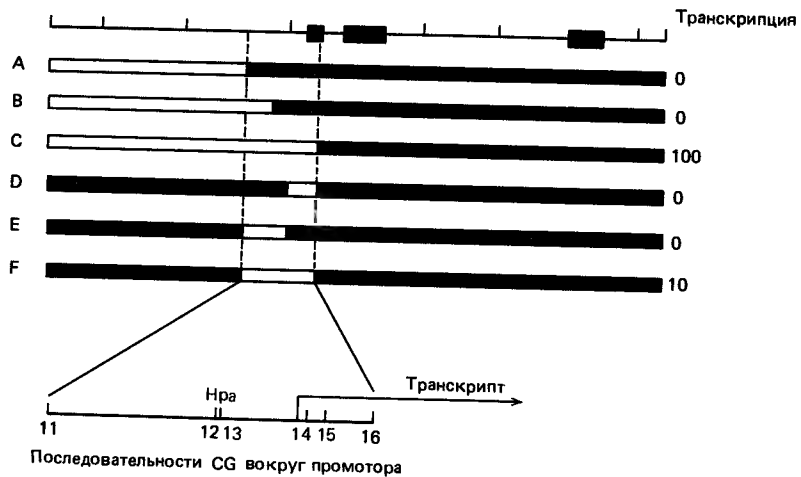
Рис. 10-12. Влияние метилирования на транскрипцию гена γ -глобина (задача 10-20). **А.** Фрагмент, образующийся при обработке HindIII и содержащий ген γ -глобина.

Указаны сайты расщепления чувствительными к метилированию рестриктазами CfoI и HpaII и размеры наиболее крупных фрагментов, выявляемых в геле, (см. рис. 10-13). **Б.** Метилированные конструкции гена γ -глобина. Метилированные части гена отмечены черным цветом. Внизу показано более подробно шесть сайтов CG вокруг промотора. Уровень экспрессии РНК γ -глобина для каждой конструкции приведен справа и выражен как процент от экспрессии конструкции, не содержащей метилированных сайтов.

А. Карта рестрикции



Б. Конструкции

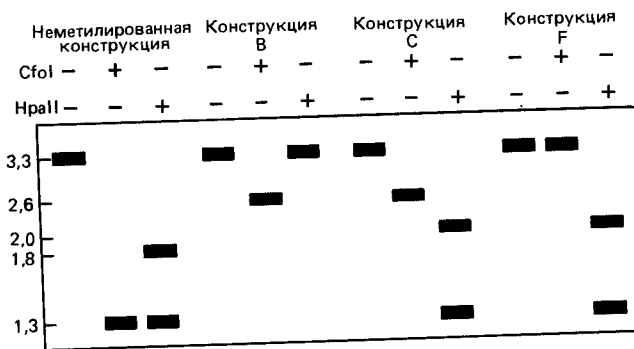


ческого мутагенеза и затравочного синтеза в присутствии 5-метил-dCTP. Эти конструкции приведены на рис. 10-12; метилированные области отмечены черным. В нижней части рисунка показано расположение вокруг промотора шести сайтов метилирования. В конструкции Е не метилированы сайты 11, 12 и 13, в конструкции D не метилированы сайты 14, 15 и 16, в конструкции F все шесть сайтов остаются неметилированными. Вы вводите эти конструкции в фибробласты мыши, выращиваете линии клеток с отдельными конструкциями и измеряете уровень синтеза в них РНК γ -глобина, который сравниваете с уровнем синтеза в линиях клеток, содержащих полностью неметилированную конструкцию (рис. 10-12, Б).

Для проверки того, что характер метилирования наследуется точно, вы получаете препараты ДНК из линий клеток, содержащих конструкции В, С и F, и обрабатываете их HindIII в сочетании с CfoI или с HpaII. CfoI и HpaII не расщепляют узнаваемые ими участки, если последние метилированы. Сайты расщепления для этих ферментов показаны на рис. 10-12, А, где указаны также размеры образующихся рестрикционных фрагментов, превышающие 1 т.п.н. Вы разделяете рестрицированные препараты ДНК в геле и визуализируете их путем гибридизации с мечеными HindIII-фрагментами (рис. 10-13).

- А.** Для получения некоторых метилированных ДНК вы используете в качестве матрицы одноцепочечный вариант гена и проводите затравочный синтез на второй цепи, вводя в реакцию вместо dCTP 5-метил-dCTP. Этот метод позволяет получить молекулу

Рис. 10-13. Рестрикционный анализ ДНК из линий клеток, содержащих конструкции В, С и F (задача 10-20). Фермент HindIII присутствовал при всех вариантах обработки. Фрагменты размерами менее 1 т. п. н. не указаны.



ДНК, содержащую в одной цепи вместо цитозина 5-метилцитозин. После выделения колоний, содержащих такую конструкцию, вы обнаруживаете 5-метилцитозин в обеих цепях, но только в последовательностях CG. Объясните, почему 5-метил-С сохраняется в последовательностях CG и исчезает из других сайтов?

- Б. Указывает ли характер рестрикции конструкций из отдельных линий клеток (рис. 10-13) на то, что последовательности CG, метилированные во время получения конструкции (рис. 10-12), сохраняются в клетке?
- В. Сходятся ли данные по синтезу РНК γ -глобина в линиях клеток, содержащих разные конструкции (рис. 10-12), с предположением о том, что экспрессия гена определяется одним ключевым сайтом метилирования?

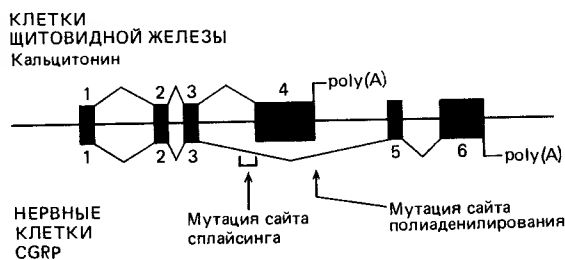
Посттранскрипционный контроль (МБК 10.4)

10-21 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Преждевременная терминация транскрипции молекулы РНК, используемая как способ контроля экспрессии гена, называется _____.
- Б. Многие гены высших эукариот образуют несколько по-разному сплайсированных молекул РНК из одного первичного транскрипта за счет _____.
- В. Различные белки, имеющие сходные функции и синтезируемые на молекулах мРНК, образованных из одного и того же первичного транскрипта РНК в результате альтернативного сплайсинга, называются _____.
- Г. _____ — это любая последовательность ДНК, транскрибируемая как отдельная единица и кодирующая одну или несколько близкородственных полипептидных цепей или молекул структурных РНК.
- Д. Трансляцию молекул мРНК, кодирующих ферритин, блокируют белки, которые связываются с 5'-концами этих молекул в отсутствие железа. Это пример _____ контроля на уровне _____.
- Е. В _____ контроле на уровне _____ могут участвовать определенные последовательности мРНК, которые обладают преимущественным сродством к рибосомам.
- Ж. _____ — явление, обычное для ретровирусов — приводит к тому, что с одной молекулы мРНК могут синтезироваться два или более белка в различных количествах.
- З. В некоторых случаях нуклеотидная последовательность первичного транскрипта РНК может изменяться в ходе процесса, называемого _____.

- 10-22** Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.
- А. У прокариот и эукариот в аттенуации транскрипции участвуют рибосомы, которые движутся по новосинтезированной РНК в ходе ее трансляции.
 - Б. Обычно при заменах экзонов в ходе альтернативного сплайсинга РНК образуются родственные белки, но существуют и исключения, когда получаются два совершенно разных белка.
 - В. Транспозиция Р-элемента у дрозофил происходит в клетках зародышевой линии, но не в соматических клетках. Последние не могут удалить отдельный интрон из мРНК транспозазы, поэтому в них Р-элемент не переносится.
 - Г. Изменение сайта разрезания и полиаденилирования транскрипта РНК может привести только к такому изменению карбоксильного конца белка, которое связано с добавлением (или удалением) аминокислотных остатков.
 - Д. На поздних стадиях аденовирусной инфекции транспорт РНК клеток-хозяев из ядра блокируется, в результате чего большинство РНК, достигающих цитоплазмы, — это РНК, закодированные в геноме аденовируса.
 - Е. Связывание железа с чувствительным к железу элементом, расположенным на 5'-конце мРНК ферритина, повышает стабильность мРНК, в результате чего увеличивается число синтезируемых молекул ферритина в ответ на увеличение концентрации железа.
 - Ж. Для инициации эукариотических мРНК, несущих на 5'-конце необычно длинные лидерные последовательности с дополнительными кодонами AUG, требуется связывание молекул — активаторов трансляции с последовательностью энхансера трансляции, расположенной рядом с соответствующим кодоном AUG.
 - З. Все материнские мРНК, содержащиеся в яйцеклетках моллюска, транслируются *in vitro*, только будучи освобождены от связанных с ними белков, следовательно для объяснения того, почему в яйцеклетке не транслируются некоторые классы материнских мРНК, можно предположить взаимодействие с регуляторными молекулами.
 - И. Стабильность мРНК трансферринового рецептора и способность мРНК ферритина транслироваться зависят от одного и того же РНК-связывающего белка, чувствительного к железу. В обоих случаях связывание этого белка с мРНК приводит к увеличению содержания белка, кодируемого этой мРНК.
 - К. В транскриптах РНК, кодирующих белки в митохондриях трипаносом, один или более урациловых нуклеотидов могут либо добавляться, либо исключаться из определенных областей транскрипта, что меняет смысл информации.
 - Л. Многие реакции, катализируемые РНК в современных клетках, могут представлять собой молекулярные реликты, т.е. следы, оставшиеся от сложной цепи опосредуемых РНК реакций, которые, возможно, преобладали в клеточном метаболизме первых организмов.
- 10-23** Разделение эукариотических генов на экзоны и интроны позволяет получать несколько продуктов с одного и того же гена путем альтернативного процессинга РНК. В программах, реализуемых в процессе развития, для получения на одной транскрипционной единице различных тканеспецифических вариантов часто используются альтернативный сплайсинг или альтернативное полиаденилирование.

с. 10-14. Структура и тканеспецифичный сплайсинг гена, кодирующего кальцитонин и пептид CGRP (задача 10-23). Экзоны обозначены черными прямоугольниками. Сайты сплайсинга/полиаденилирования для образования кальцитонина отмечены над линией, а для образования CGRP — под линией. Стрелками отмечено положение мутаций в сайтах сплайсинга/полиаденилирования.



Одним из таких дифференциально используемых генов является ген, кодирующий гормон кальцитонин (небольшой пептид). Ген кальцитонина содержит шесть экзонов. В клетках щитовидной железы продуцируется мРНК, кодирующая кальцитонин. В этой мРНК содержатся экзоны 1, 2, 3 и 4, причем в качестве сайта полиаденилирования используется конец экзона 4. В нервных клетках этот же ген дает не кальцитонин, а родственный кальцитонину пептид CGRP (calcitonin gene-related protein). мРНК этого пептида содержит экзоны 1, 2, 3, 5 и 6. Данный ген и его тканеспецифичный процессинг схематически представлены на рис. 10-14. В обоих типах клеток транскрипция начинается в одном и том же месте и заканчивается за экзonom 6.

Механизм альтернативного процессинга транскриптов кальцитонина /CGRP неясен. Поскольку в ходе процессинга в разных тканях используются разные сайты полиаденилирования и разные сайты сплайсинга, то можно предположить, что как при полиаденилировании, так и при сплайсинге действуют тканеспецифические факторы, регулирующие экспрессию кальцитонина и CGRP. Существует две популярные гипотезы. Согласно одной, клетки щитовидной железы продуцируют кальцитонин потому, что в них содержится специфический фактор, узнающий с высокой эффективностью сайт полиаденилирования в экзоне 4 и вызывающий расщепление РНК-предшественника до того, как может произойти сплайсинг экзона 3 и экзона 5. В нервных клетках этот фактор отсутствует. В результате в них преобладает соединение экзона 3 с экзonom 5, что приводит к образованию мРНК CGRP. Согласно другой гипотезе, образование той или иной РНК зависит от выбора сайтов сплайсинга. В клетках щитовидной железы образуется кальцитонин, потому что в них экзон 3 соединяется с экзonom 4, а в нервных клетках образуется CGRP, потому что в них экзон 3 соединяется с экзonom 5. Можно предположить, что в клетках одного или обоих типов образуется фактор, способствующий преобладанию одного из направлений сплайсинга.

Для проверки этих гипотез сигналы сплайсинга и полиаденилирования, расположенные на конце экзона 4, изменяли посредством мутаций (рис. 10-14). Измененные гены вводили в культивируемые лимфоциты, образующие в норме только кальцитонин. Полученные мутантные клетки, у которых отсутствовал сайт полиаденилирования в экзоне 4, вообще не образовывали мРНК этого гена, а у мутантных клеток, не содержащих в экзоне 4 сайта сплайсинга, синтезировалась только мРНК CGRP.

- А. Содержат ли культивируемые лимфоциты факторы сплайсинга и полиаденилирования, необходимые как для образования мРНК кальцитонина, так и для образования мРНК CGRP?
- Б. Если альтернативный процессинг зависит от отбора сайта полиаденилирования, то какой из мутантных генов при введении

в культивируемые лимфоциты должен образовывать мРНК CGRP?

В. Если альтернативный процессинг происходит путем отбора сайтов сплайсинга, то какой из мутантных генов при введении в культивируемые лимфоциты должен образовывать мРНК CGRP?

Г. Какая из двух гипотез лучше объясняет способность культивируемых лимфоцитов образовывать мРНК кальцитонина, а не CGRP?

10-24 Ферритин — это белок, который во многих тканях служит для запасаания железа. В присутствии железа синтез ферритина повышается почти в два раза. Вы хотите изучить молекулярные механизмы индукции синтеза ферритина. В особенности вас интересует, на каком уровне осуществляется контроль: во время транскрипции или после нее.

Вы проводите серию экспериментов, в которых вводите крысам железо (в виде раствора соли железа) или физиологический раствор с одновременной инъекцией актиномицина D (мощный ингибитор синтеза РНК) или без нее. Через три часа вы забиваете крыс, гомогенизируете их печень и выделяете фракции полисом и супернатанта. Затем выделяете из каждой фракции РНК и проводите трансляцию в бесклеточной системе в присутствии меченых аминокислот. Вы измеряете синтез суммарного белка по включению метки в белок, а синтез ферритина определяете путем осаждения антителами, специфичными к ферриту (табл. 10-4).

Таблица 10-4. Синтез ферритина в клетках крысы после различных вариантов обработки (задача 10-24)

Добавленное вещество	Актиномицин D	Фракция	Суммарный синтез	Синтез ферритина
Хлористый натрий	Отсутствует	Полисомы	750 000	700
		Супернатант	255 000	1400
Железо	Отсутствует	Полисомы	500 000	900
		Супернатант	400 000	500
Хлористый натрий	Присутствует	Полисомы	800 000	800
		Супернатант	600 000	3000
Железо	Присутствует	Полисомы	780 000	1380
		Супернатант	550 000	700

Числовые данные означают радиоактивность (количество импульсов в минуту), включившуюся в суммарный белок или в ферритин.

А. Рассчитайте для каждого препарата, сколько процентов составляет синтез ферритина от синтеза суммарного белка. Приняв, что 85% суммарной мРНК во фракции полисом связано с рибосомами и 15% находится в свободном состоянии (в супернатанте), определите для каждого случая, сколько процентов составляет мРНК ферритина во фракции полисом и в супернатанте. (Примем, что процент мРНК в полисомной фракции и в супернатанте не меняется под действием актиномицина D.)

Б. Как с помощью ваших результатов можно определить, происходит регуляция синтеза ферритина (в зависимости от содержания железа) на уровне транскрипции или после нее?



10-15. Синтез белка в лизате ретикулоцитов (задача 10-25).

М R E I	Регуляция
---ATGAGGGAAATC---	+
---T---	-
---C---	+
---C---	-
---A---	+
---T---	-
---G---	-
---G---	+
---TA---	-
---C-C---	+
---G-A---	-
---G-T---	-
---C-G---	+

с. 10-16. Влияние мутаций на регуляцию стабильности мРНК тубулина (задача 10-26). Последовательность дикого типа для первых двенадцати нуклеотидов кодирующей части гена показана вверху, над стрелками указаны первые 4 замещенные аминокислоты, начиная с метионина (М). Нуклеотидные замены у двенадцати мутантов приведены ниже, причем указаны только измененные нуклеотиды. Регуляция стабильности мРНК отмечена справа: знак (+) означает цвет дикого типа на изменении во внутриклеточной концентрации тубулина, знак (-) — отсутствие цвета на изменения

В. Как объяснить возрастание в два раза синтеза ферритина в присутствии железа?

10-25 Весьма активную белоксинтезирующую бесклеточную систему можно получить из ретикулоцитов, которые представляют собой незрелые эритроциты, уже лишенные ядра, но еще сохранившие рибосомы. Лизат ретикулоцитов при условии добавления гема способен многократно транслировать каждую глобиновую мРНК. Гем несет две функции: он необходим для сборки гемоглобина и, как ни странно, для поддержания высокого уровня синтеза белка. Если не добавить гем, синтез белка через непродолжительное время останавливается (рис. 10-15).

Первые сведения о том, как воздействует гем на синтез глобина, были получены в простом опыте. Лизат ретикулоцитов инкубировали в течение нескольких часов в отсутствие гема. Если 5 мкл такого предынкубированного лизата добавляли к 100 мкл свежего лизата в присутствии гема, то наступало быстрое подавление белкового синтеза (рис. 10-15). В ходе дальнейшего изучения было показано, что ингибитор (названный гем-контролирующим репрессором, HCR) представляет собой белок с молекулярной массой около 180 000. Очищенные препараты HCR в концентрации 1 мкг/мл полностью подавляли синтез белка в свежих лизатах, содержащих гем.

- А. Рассчитайте отношение числа молекул HCR к числу рибосом и молекул глобиновой мРНК при концентрации HCR, подавляющей синтез белка. Лизаты ретикулоцитов содержат рибосомы в количестве 1 мг/мл (молекулярная масса рибосомы около 4 млн), средняя полисома содержит 4 рибосомы на одну молекулу глобиновой мРНК.
- Б. Каков механизм ингибирования белкового синтеза в лизате ретикулоцитов репрессором HCR — каталитический или стехиометрический, если судить по результатам расчета?

10-26 Уровень экспрессии гена тубулина устанавливается при помощи необычного способа регуляции: скорость синтеза нового тубулина регулируется внутриклеточной концентрацией свободных димеров тубулина (состоящих из одной субъединицы α -тубулина и одной субъединицы β -тубулина). Первые данные о существовании подобной саморегуляции получены в экспериментах с препаратами, которые вызывают сборку или диссоциацию всего тубулина в клетке. Если, например, обработать клетку колхицином, который вызывает распад микротрубочек на отдельные субъединицы тубулина, то наблюдается десятикратное снижение синтеза тубулина. Такая саморегуляция синтеза тубулина его димерами происходит не на уровне транскрипции, а скорее всего на уровне стабильности тубулиновой мРНК. Оказалось, что сайт, ответственный за саморегуляцию, содержится в последовательности первых 12 нуклеотидов кодирующей части мРНК.

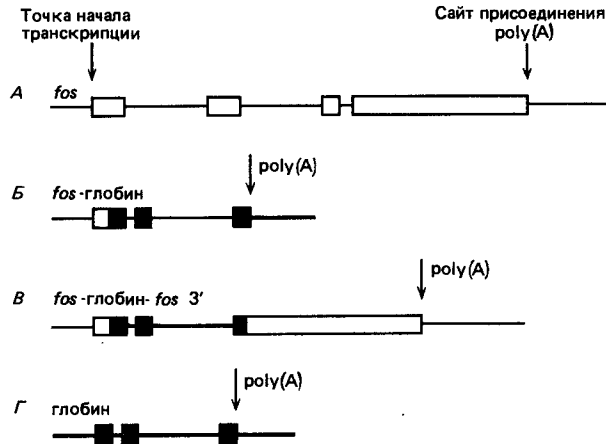
Поскольку этот важный фрагмент мРНК перекрывается с кодирующим участком, то неясно, чем обусловлена регуляция стабильности мРНК: взаимодействием свободных димеров тубулина с РНК или их взаимодействием с новосинтезированным белком. Каждое из этих взаимодействий могло бы, вероятно, запустить активность нуклеазы, которая разрушает мРНК.

Эти два предположения были проверены с помощью клонированных вариантов гена, содержащих мутации в регуляторной области. Полученные мутантные гены вводили в клетки и изучали

Рис. 10-17. Структура генов β -глобина человека и гибридных генов β -глобина (10-27). Светлые полосы обозначают экзон, а черные — интрон. Гены $c-fos$ и $c-fos$ в гибридных генах.

Рис. 10-18. Структура гибридных генов $c-fos$ и $c-fos$ (10-27). Верхняя часть представляет собой экзон, содержащий ген $c-fos$. Нижняя часть — транскрипт (мРНК), синтезированный в клетке, который не подвергается сплайсингу.

Рис. 10-17. Строение гена *c-fos* человека и гибридов гена *c-fos* с геном β -глобина человека (задача 10-27). Светлые прямоугольники обозначают экзоны гена *c-fos*, а черные экзоны β -глобина. Соединения между последовательностями генов *c-fos* и глобинового гена в гибридных генах локализованы в экзонах.



ли стабильность их мРНК при повышенной внутриклеточной концентрации свободных димеров тубулина. Результаты, полученные для двенадцати мутантов с измененной короткой последовательностью мРНК, приведены на рис. 10-16.

От чего зависит регуляция стабильности мРНК тубулина: от взаимодействия его димеров с РНК или от их взаимодействия с закодированным белком? Объясните, на чем основан ответ.

10-27 Ген *c-fos* является клеточным гомологом онкогена, содержащегося в вирусе FBV остеосаркомы мыши. Функция его неизвестна. Активация гена *c-fos* – один из первых транскрипционных ответов на присутствие факторов роста: уровень транскрипции гена *c-fos* в клетках мыши значительно возрастает в первые 5 мин, достигает максимума к 10–15-й мин и затем резко снижается.

Для изучения временного механизма индукции гена *c-fos* человека вы клонируете фрагмент ДНК, содержащий полную транскрипционную единицу, начинающуюся за 750 нуклеотидов до точки начала транскрипции и оканчивающуюся через 1,5 т. п. н. после сайта полиаденилирования (рис. 10-17, A). Если вы вводите такой клонированный фрагмент в клетки мыши (что позволяет отличить мРНК гена *c-fos* человека от эндогенного продукта клеток) и лишь на следующий день стимулируете рост клеток путем добавления сыворотки (богатый источник факторов роста), то наблюдается тот же тип индукции во времени, хотя она несколько более длительная, чем в случае гена мыши (рис. 10-18, A).

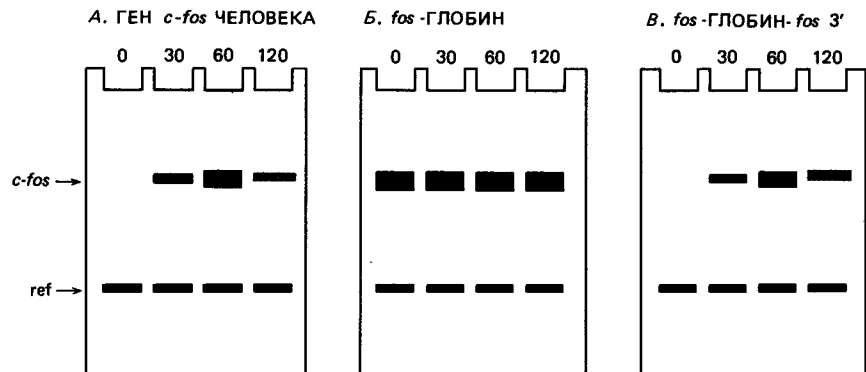


Рис. 10-18. Реакции гена *c-fos* и гибридных генов на добавление сыворотки крови (задача 10-27). Верхняя полоса в каждом геле представляет собой транскрипт, содержащий последовательность *c-fos*. Нижняя полоса – маркерный транскрипт (для контроля выхода РНК), синтезированный на гене, который не реагирует на добавление сыворотки.

Проанализировав серию делеционных мутантов, вы покажете, что для усиления транскрипции в ответ на сыворотк необходим элемент SRE, напоминающий энхансер (segment response element – элемент ответа на сыворотку) и расположенный 300 нуклеотидов до точки начала транскрипции. Вы изучаете также стабильность мРНК гена *c-fos*, получая различные гибридные гены, в которых содержатся части гена β -глобина человека кодирующего очень стабильные мРНК. Строение глобинового гена и гибридных генов приведено на рис. 10-17, Б В и Г. При введении гибридных генов в клетки, растущие при низком содержании сыворотки, они отвечают на дополнительное введение сыворотки через 24 ч, как это показано на рис. 10-18, Б и В.

- А. Какая часть гена *c-fos* ответственна за нестабильность мРНК *c-fos*?
- Б. Гибридный ген *fos*-глобин содержит все обычные регуляторные элементы гена *c-fos*, включая и SRE, и тем не менее его мРНК присутствует в начальный момент времени (через 24 ч после трансфекции, но до введения сыворотки) и ее количество увеличивается соответствующим образом после введения сыворотки. Можете ли вы объяснить это на основании стабильности мРНК?

10-28 В составе липопротеинов плазмы крови присутствуют две близкородственные формы аполипопротеина В (apo-B). У человека в печени синтезируется apo-B100, который необходим для сборки липопротеинов с очень низкой плотностью (VLDL – very low density lipoproteins) и для транспорта эндогенно синтезируемых триглицеридов. Apo-B48 синтезируется в кишечнике; он необходим для образования желудочного сока, а также для всасывания и переноса холестерина и триглицеридов из пищи. Ряд данных указывает на то, что apo-B48 представляет собой аминоконцевую половину apo-B100. Какова же взаимосвязь между этими двумя белками? Являются ли они продуктами разных генов или кодируются одним и тем же геном, образуясь при этом в ходе тканеспецифического процессинга РНК или тканеспецифического расщепления белка?

С помощью методов генной инженерии были проклонированы кДНК-копии матричной РНК из клеток печени и кишечника человека. При изучении нескольких клонов для каждого вида ткани обнаружилось всего лишь одно отличие: кДНК из клеток кишечника содержала Т в составе стоп-кодона в том месте, где у кДНК из клеток печени присутствовал С в составе кодона глутамина (рис. 10-19). Чтобы более подробно изучить это различие в мРНК, а также соответствующие ему различия в геноме, область, содержащую изменения, амплифицировали, используя метод PCR (polymerase chain reaction – полимеразная цепная реакция). Из клеток кишечника и печени выделяли РНК и ДНК, а затем подвергали их PCR-амплификации, используя олигонуклеотиды, комплементарные крайним (фланкирующим) участкам изучаемой области. Затем в полученных амплифицированных фрагментах ДНК каждого из четырех препаратов уже непосредственно определяли изменения, гибридизуя эти фрагменты с олигонуклеотидами, содержащими либо последовательности кДНК из печени (олиго-Q), либо последовательности кДНК из кишечника (олиго-STOP). Результаты приведены в табл. 10-5.

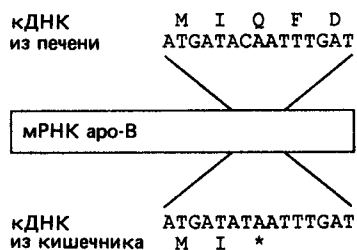


Рис. 10-19. Локализация различий в последовательностях клонов кДНК-копий матричных РНК apo-B, выделенных из печени и кишечника (задача 10-28). Закодированные в последовательности аминокислоты указаны над последовательностью кДНК или под ней.

Таблица 10-5. Гибридизация специфических олигонуклеотидов с амплифицированными сегментами РНК и ДНК из печени и кишечника (задача 10-28)

	РНК		ДНК	
	Печень	Кишечник	Печень	Кишечник
Олиго-Q	+	—	+	+
Олиго-STOP	—	+	—	—

Олиго-Q – олигонуклеотид, комплементарный последовательности кДНК печени, олиго-STOP – олигонуклеотид, комплементарный последовательности кДНК кишечника. Гибридизация проводилась в очень жестких условиях, так что если не спаривался даже один нуклеотид, гибридизации не происходило.

Каким образом эти результаты позволяют выявить механизм тканеспецифического синтеза аро-B100 в клетках печени и аро-B48 в клетках кишечника? Как образуются эти две формы аро-B: в результате контроля на уровне транскрипции двух разных генов, в результате контроля на уровне процессинга транскриптов РНК с одного гена или путем дифференциального расщепления белкового продукта, кодируемого одним и тем же геном?

Организация и эволюция ядерного генома (МБК 10.5)

10-29 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- Тандемные повторы простой последовательности называют _____, поскольку впервые обнаруженные ДНК такого типа имели необычное соотношение нуклеотидов, что позволило выделить их из суммарной клеточной ДНК как минорные компоненты.
- Некоторые _____ перемещаются в хромосомах с места на место в виде ДНК, тогда как многие другие перемещаются в форме промежуточной РНК.
- Почти одновременное перемещение транспозонов нескольких типов, которое называется _____, может приводить к катастрофическим изменениям в геноме.
- Две перемещаемые последовательности ДНК, образно говоря, наводнили геном человека: более длинный _____, составляющий около 4% нашей ДНК, и более короткая _____, составляющая около 5% нашей ДНК.

10-30 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие – нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- У любого конкретного вида функции большинства генов, вероятно, уже оптимизированы в отношении изменчивости, вызываемой точковыми мутациями.
- Тандемно повторяющиеся функциональные гены в основном остаются неизменными благодаря неравному кроссинговеру и конверсии генов, однако нефункциональная спейсерная ДНК, расположенная между ними, подвержена быстрой дивергенции.
- Разделение дуплицированных генов с различающимися функ-

- пиями, вероятно, способствует их стабилизации, предохраняя эти гены от процессов гомогенизации, которым подвергаются тесно сцепленные гены со сходными последовательностями.
- Г. Длинные интроны, расположенные между экзонами, повышают вероятность рекомбинации, приводящей к дупликации экзонов или соединению экзонов разных генов.
- Д. Отсутствие интронов в генах прокариот свидетельствует о том, что интроны возникли у эукариот через некоторое время после эволюционного разделения на линии эукариот и прокариот.
- Е. Последовательности сателлитной ДНК обычно не транскрибируются и чаще всего локализованы в гетерохроматине, расположенном в области центромеры.
- Ж. Подвижные элементы часто встречаются в геномах высших эукариот, но перемещаются они столь редко, что вносят весьма незначительный вклад в вариабельность видов.
- 3. Организация генома у высших эукариот — некодирующие участки длинные, кодирующие области короткие, а также регуляторные транскрипции с большого расстояния способствуют тому, что передвижение подвижных элементов не разрушает кодирующие последовательности, но влияет на экспрессию генов.
- И. Изменяя одновременно несколько свойств организма, транспозиционные взрывы повышают вероятность того, что два новых признака, комбинация которых может оказаться выгодной, проявятся у одной и той же особи в какой-либо популяции.
- К. Поскольку *Alu*-последовательности транскрибируются РНК-полимеразой II, их передвижение по геному связано со встраиванием поблизости от промотора, узнаваемого полимеразой II.

10-31 Медленное изменение частоты нейтральных мутаций в пуле генов какого-либо вида служит причиной того, что отдельный ген часто присутствует в популяции в нескольких формах, слегка отличающихся друг от друга. Некоторые мутации приводят к изменению или исчезновению функции кодируемого продукта, а следовательно, они могут приводить к возникновению наследственных болезней. Другие мутации, не затрагивающие важных кодирующих участков, обычно приводят к возникновению различий в сайтах рестрикции, в результате чего возникает полиморфизм длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ, или RFLPs — restriction-fragment-length polymorphisms). Анализ ПДРФ позволяет проследить за наследуемостью определенных участков хромосом. При определенных условиях по наличию ПДРФ выявить дефектного гена можно узнать, имеется ли ген, вызывающий заболевание, у еще не родившегося ребенка.

Супружеская пара, которую волнует этот вопрос, пришла к вам на генетическую консультацию. Их второй ребенок умер вскоре после рождения от наследственного заболевания, и мать опять ждет ребенка. Умерший ребенок был вторым заболевшим в семье. Брат бабушки со стороны отца также был болен. Супруги хотят узнать, унаследует ли их еще не родившийся ребенок эту болезнь. Вы изучали генетику заболевания, определяемого этим аутосомным рецессивным геном, и считаетесь в этой области признанным специалистом. Область хромосомы, в которой локализован этот ген, имеет несколько участков, где при анализе популяции проявляется полиморфизм сайтов рестрикции, как показано на рис. 10-20, А. Полиморфизм сайтов рестрикции в популяции отмечен знаком (+/—).

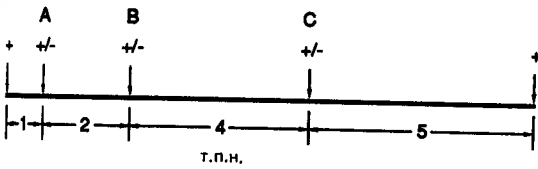
Вы выделяете препараты ДНК обоих родителей, всех бабушек

Рис.
(А)
сущ
лева
ДНК
(зад
обоз
озна
в т.
жен
и тр
реб

Рис.
для
несу

Рис.
ных
геном
гибри
ченн
Числ
обра
R—E
K—K
ДНК

А. Карта рестрикции



Б. ГЕНЕАЛОГИЯ

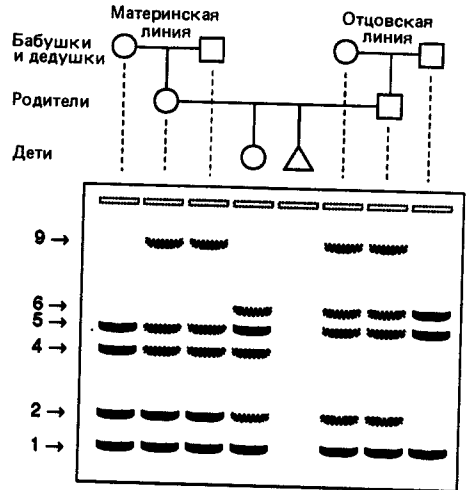
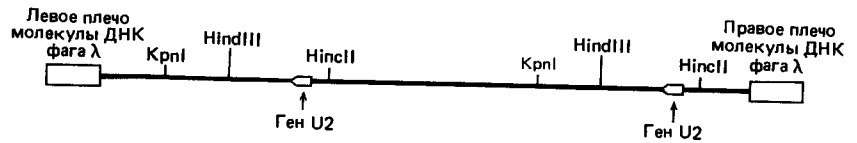


Рис. 10-20. Рестрикционная карта (А) для области хромосомы, несущей ген, который вызывает заболевание, и результаты рестрикции ДНК (Б) от разных членов семьи (задача 10-31). Полиморфные сайты обозначены А, В и С. Числа означают размеры фрагментов в т.п.н. Кругами обозначены женщины, квадратами – мужчины и треугольником – неродившийся ребенок.

Рис. 10-21. Рестрикционная карта для клона бактериофага лямбда, несущего два гена U2 (задача 10-32).



и дедушек, а также здорового ребенка и проводите картирование с помощью рестриктаз, как показано на рис. 10-20, Б. Теперь вы готовы проанализировать ДНК плода. Какие полосы рестриктоукажут, что плод, вероятно, унаследовал болезнь?

10-32 Вас интересуют гены человека, кодирующие малые ядерные U2-РНК (U2-мяРНК); они содержатся в ядре в количестве тысяч копий и играют важную роль в процессинге мРНК. С использованием радиоактивно меченной U2-мяРНК вы выделили клон бактериофага лямбда, несущий две копии гена U2, расположенные на расстоянии 6 т.п.н. друг от друга. Рестрикционная карта ДНК этого клона представлена на рис. 10-21. Когда вы полностью рестрицируете геномную ДНК человека ферментами HindIII, HincII (H2) или KpnI (K) и анализируете фрагменты, получившиеся в результате рестрикции, методом блот-гибриди-

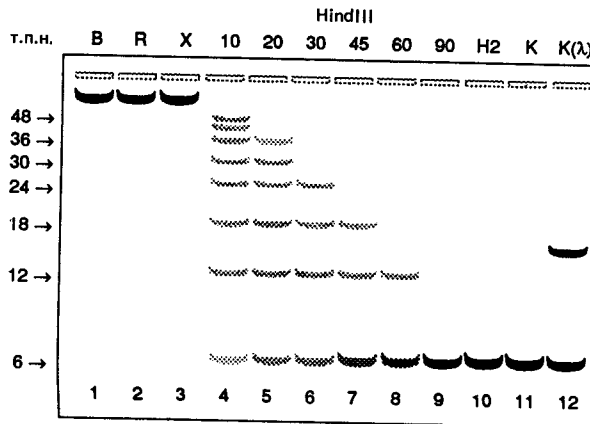


Рис. 10-22. Радиоавтограф различных рестрикционных фрагментов геномной ДНК человека после их гибридизации с радиоактивно меченным геном U2 (задача 10-32). Числа под HindIII означают время обработки в минутах. В – BglII, R – EcoRI, X – XbaI, H2 – HincII, K – KpnI, K(λ) – клонированная ДНК, обработанная KpnI.

зации с геном U2, то обнаруживаете единственную интенсивную полосу, содержащую фрагменты размером 6 т. п. н. (рис. 10-22, дорожки с 9-й по 11-ю). Если вы разрезаете геномную ДНК рестриктазами BglII (B), EcoRI (R) или XbaI (X), которые не расщепляют последовательности клонированных генов (рис. 10-21), то также обнаруживаете единственную интенсивную полосу, однако размеры содержащихся в ней фрагментов превышают 50 т. п. н. (рис. 10-22, дорожки с 1-й по 3-ю). Если проинкубировать геномную ДНК с HindIII, отбирая аликвоты в разные промежутки времени, то вы увидите лесенку полос (дорожки с 4 по 9). Если 2 нг клонированной ДНК разрезать KpnI и после этого нанести на гель параллельно 10 мкг геномной ДНК, обработанной KpnI, то будут видны две полосы, интенсивность которых равна интенсивности полосы фрагмента размером 6 т. п. н., полученного при обработке всей геномной ДНК рестриктазами (сравните дорожки 11 и 12).

- А. Объясните, как путем изучения смеси рестрикционных фрагментов можно определить строение генов U2 в геноме человека.
- Б. Почему в случае обработанной рестриктазами клонированной ДНК (дорожка 12) при электрофорезе видны две полосы, тогда как в случае обработанной рестриктазами геномной ДНК наблюдается только одна полоса (дорожка 11)?
- В. С учетом того, что 2 нг клонированной ДНК дают полосу, равную по интенсивности той полосе, которую дают 10 мкг геномной ДНК (дорожки 11 и 12), рассчитайте, сколько копий гена U2 присутствует в геноме человека. (Размер ДНК в клоне бактериофага лямбда составляет 43 т. п. н., а в геноме человека содержится 3 млн. т. п. н.)

10-33 Цветное зрение у человека определяется тремя различными зрительными пигментами, поглощающими свет в красной, зеленой и синей областях видимого спектра. Потеря одного из этих пигментов приводит к дальтонизму. Примечательно, что около 8% всех мужчин имеют дефекты цветового зрения, сцепленные с X-хромосомой и затрагивающие красный или зеленый пигменты. Дальтонизм по голубому цвету – аутосомный признак – встречается крайне редко.

Гены человека, кодирующие зрительные пигменты, были обнаружены путем выявления генов, гомологичных клонированному гену бычьего родопсина, который кодирует зрительный пигмент, находящийся в палочках сетчатки и определяющий черно-белое зрение. Таким способом было идентифицировано четыре типа генов: ген родопсина и три других гена (один аутосомный и два сцепленных с X-хромосомой), кодирующих белки, структура которых весьма сходна с родопсином. Два гена,

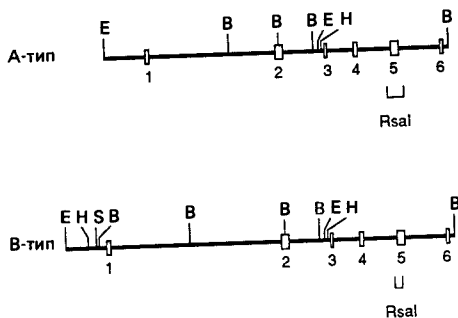


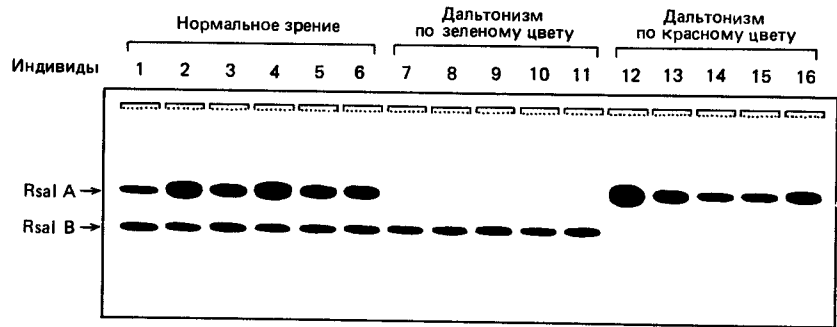
Рис. 10-23. Рестрикционные карты генов зрительных пигментов А-типа и В-типа (задача 10-33). Экзоны обозначены маленькими светлыми прямоугольниками. Участки ПДРФ, выявленные при обработке RsaI, обозначены под генами. E – EcoRI, B – BamHI, H – HindIII, S – SalI.

Рис. 10-24. Г... обработка р... нормальных... ников, не во... ный цвет, и... воспринимав... (задача 10-3... специфичны... обозначен R... для гена В-т... Индивиды с...

Индивиды	Соотношение А
т.п.н.	
222	
183	
144	
105	
66	

Рис. 10-25 ной NotI, д... ных мужч... 10-33). Ци... индивидов... на рис. 10... А-типа и... интенсивн... рис. 10-24... образующ... NotI, указ...

Рис. 10-24. ПДРФ, выявляемый при обработке рестриктазой RsaI, у нормальных мужчин, у дальтоников, не воспринимающих зеленый цвет, и у дальтоников, не воспринимающих красный цвет (задача 10-33). Вариант ПДРФ, специфичный для гена А-типа, обозначен RsaI A; вариант ПДРФ для гена В-типа обозначен RsaI B. Индивиды обозначены номерами.



сцепленные с X-хромосомой и предположительно кодирующие красный и зеленый пигменты, идентичны на 98% как в области экзонов, так и в области интронов. Рестрикционные карты этих двух генов (А-типа и В-типа) приведены на рис. 10-23. Гены можно различить благодаря полиморфизму длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ), один из которых (при обработке RsaI) показан под картами генов на рис. 10-23. Для проверки того, что именно эти гены кодируют красный и зеленый пигменты, обследовали нескольких нормальных мужчин и нескольких дальтоников по красному или зеленому цвету. В этих экспериментах использовали гибридационные зонды, специфичные для ПДРФ-маркеров, выявляемых при обработке RsaI (рис. 10-24).

Удивительную вариабельность по наблюдаемому числу генов А-типа изучали путем обработки препаратов ДНК определенных индивидов рестриктазой NotI, последующего разделения получаемых длинных рестриков методом пульс-электрофореза и гибридализации их с зондом, комплементарным к обоим генам (рис. 10-25).

- Какие гены кодируют красный зрительный пигмент и какие зеленый?
- Генетический анализ показал, что гены, кодирующие красный и зеленый зрительные пигменты, расположены на X-хромосоме рядом друг с другом. Каким образом эксперименты, описанные выше, позволяют сделать вывод, что эти гены физически сцеплены?
- Зонд, специфичный для уникальных последовательностей, расположенных непосредственно перед 5'-концом гена В-типа, гибридизуется с рестриком 32 т.п.н., получившимся в результате обработки SfiI. Один конец этого фрагмента образуется при разрезании внутри гена, а другой при расщеплении в участке вне данного гена. Этот SfiI-фрагмент разрезается в свою очередь рестриктазой NotI, которую использовали для анализа, показанного на рис. 10-25. Исходя из этой информации определите, какой ген расположен на 5'-конце этого кластера, а какой на 3'-конце. (За 5'-конец кластера принимается конец вблизи 5'-конца первого гена.)
- Почему у мужчин с нормальным цветовым зрением число генов А-типа варьирует? Почему вариабельность числа генов у нормальных мужчин приводит к высокой частоте дальтонизма?

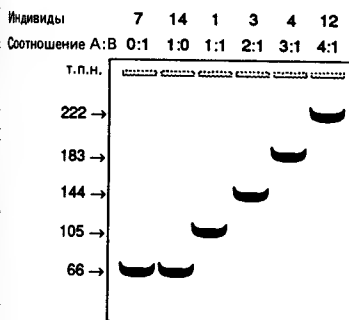
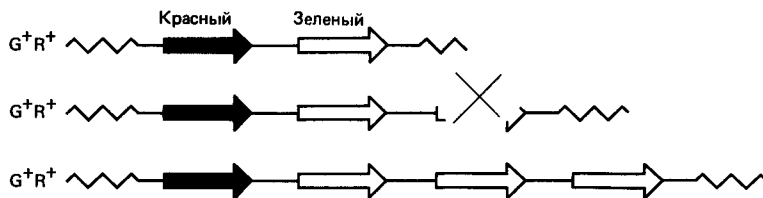


Рис. 10-25. Фрагменты обработанной NotI ДНК некоторых нормальных мужчин и дальтоников (задача 10-33). Цифры, обозначающие индивидов, соответствуют цифрам на рис. 10-24. Соотношение генов А-типа и В-типа определено по интенсивности зон гибридализации на рис. 10-24. Размеры фрагментов, образующихся при расщеплении NotI, указаны в т.п.н.

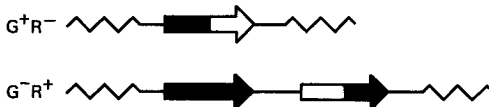
10-34 Почти два века тому назад Томас Янг выдвинул гипотезу о том, что человек воспринимает цвет благодаря существованию трех независимых механизмов, определяющих чувствительность к свету. В настоящее время известно, что эти механизмы связаны с тремя типами колбочек-фоторецепторных клеток сетчатки.

Рис. 10-26. Расположение генов у нормальных мужчин, воспринимающих все три цвета (А), у дальтоников-дихроматов (Б) и у трихроматов с аномальным цветовым зрением (В) (задача 10-34). Гены (или части генов), кодирующие красный пигмент, обозначены черными стрелками, гены (или части генов), кодирующие зеленые пигменты, обозначены белыми стрелками. Основание стрелки обращено к 5'-концу гена, острое — к 3'-концу. Тонкими линиями обозначены гомологичные участки, разделяющие гены, зигзагообразными линиями — уникальные хромосомные последовательности, окружающие эти гены.

А. ТРИХРОМАТЫ (НОРМАЛЬНОЕ ЦВЕТНОЕ ЗРЕНИЕ)



Б. ДИХРОМАТЫ



В. АНОМАЛЬНЫЕ ТРИХРОМАТЫ



Колбочки каждого типа содержат свой зрительный пигмент: красный, голубой или зеленый, которые и определяют спектральные свойства колбочек каждого типа. К дальтонизму могут приводить два вида пигментных аномалий. Люди, у которых отсутствует один из зрительных пигментов, не имеют колбочек соответствующего типа. Такие люди называются дихроматами, т.е. различающими два основных цвета. Люди, у которых образуются зрительные пигменты с аномальным спектром поглощения, имеют колбочки всех трех типов, но один из этих типов оказывается аномальным. Такие люди называются аномальными трихроматами.

Вы проанализировали структуры генов, кодирующих красный и зеленый пигменты у 25 мужчин, страдающих дальтонизмом по красному или зеленому цвету. Примеры структур генов у дихроматов, не воспринимающих красный ($G^+ R^-$) или зеленый цвет ($G^- R^+$), а также у трихроматов, аномальных по красному ($G^+ R'$) или зеленому ($G' R^+$) цвету, даны на рис. 10-26 вместе с тремя генетическими структурами, свойственными мужчинам с нормальным цветовым зрением (трихроматы, $G^+ R^+$).

- Объясните для каждого случая дальтонизма, как рекомбинация между двумя нормальными генами у трихроматов может привести к наблюдаемой структуре аномального гена. (Случай с дихроматом ($G^- R^+$), не видящим зеленого цвета, объяснить труднее, чем другие.)
- Как, по вашему мнению, может экспрессироваться каждый из четырех гибридных генов у дальтоников?
- Как на основании генетических структур, приведенных на рис. 10-26, можно объяснить возникновение разных типов дальтонизма?

10-35 У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Ту-элементы перемещаются на новое место в геноме в форме промежуточной РНК. Обратная транскриптаза, кодируемая Ту-элементом, обычно экспресси-

Рис. 10-28. Последовательности нуклеотидов в шести *Alu*-вставках, представленных в семействе генов альбумина человека (задача 10-36). Пунктиром обозначены нуклеотиды внутренней части *Alu*-последовательностей.

← *Alu*-повтор (300 нуклеотидов) →

```

TTAAATA|GGCCGGG-----AAAAAAAAAAAA|TTAAATA
TGTGTGGG|GATCAGG-----AAAAAAAAAAAA|TCTGTGGG
TCTTCTTA|GGCTGGG-----GAAAAAAAAAAAA|TCTTCTTA
ATAATAGTATCTGTC|GGCTGGG-----AGAAAAAAAAAAAA|TAAATAGTATCTGTC
GGATGTTGTGG|GGCCGGG-----AAAAAAAAAAAA|GGATGTTGTGG
AGAACTAAAAG|GGCTAGG-----AAAAAGAGAAGA|AGAACCGAAAG
  
```

расположены рядом). Эволюционные ветви человека и крысы дивергировали более 85 млн. лет назад при возникновении разных видов млекопитающих. Что означает присутствие *Alu*-последовательностей в этой паре генов человека и их отсутствие в этих же генах крысы — то, что эти последовательности вторглись в гены человека относительно недавно или что эти последовательности каким-то образом исчезли из генов крысы?

Для ответа на этот вопрос вы определили последовательности нуклеотидов во всех шести *Alu*-последовательностях в семействе генов альбумина человека. Последовательности, граничащие с концами встроившихся *Alu*-элементов, приведены на рис. 10-28.

- А. Отметьте левую и правую границу встроившихся *Alu*-последовательностей и подчеркните те нуклеотиды в соседних с ними участках хромосомных ДНК, которые изменились вследствие мутации.
- Б. Известно, что скорость замен нуклеотидов в интронах составляет для каждого сайта примерно 3×10^{-3} мутаций за миллион лет. Считая, что и в интронах, граничащих с этими *Alu*-последовательностями, замены происходят с той же частотой, рассчитайте, сколько лет прошло с тех пор, как *Alu*-последовательности встроились в эти гены (для расчетов объедините все *Alu*-последовательности, т. е. считайте, что они встроились примерно в одно и то же время).
- В. Почему в этих расчетах используются специфические последовательности, окружающие *Alu*-элементы? Почему не принимаются во внимание фрагменты интронов большего размера? Почему не рассматриваются мутации в самой *Alu*-последовательности?
- Г. Вторглись ли эти *Alu*-последовательности в гены человека недавно (после возникновения разных видов млекопитающих) или же они утрачены в геноме крысы?

Мышечное сокращение (МБК 11.1)

11-1 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. _____ — это сложная сеть белковых филаментов, которая позволяет клеткам эукариот принимать различные формы и совершать координированные и направленные движения.
- Б. Примерно две трети массы высушенных мышечных волокон составляют цилиндрические _____, обычно имеющие диаметр от 1 до 2 мкм и длину, равную длине мышечной клетки.
- В. «Исчерченность» мышечных клеток связана с присутствием в них регулярно повторяющихся элементов, называемых _____, каждый из которых содержит ряд светлых и темных полос.
- Г. Среди цитоскелетных белков преобладает _____, который обнаруживается как в виде глобулярных субъединиц, так и в виде филаментов толщиной 8 нм.
- Д. Толстые филаменты миофибрилл состоят в основном из белка _____.
- Е. Многие белки цитоскелета построены из двух α -спиралей, которые закручиваются одна вокруг другой, образуя _____.
- Ж. Актиновые филаменты имеют структурно различающиеся концы, которые называются _____ (или заостренными концами) и _____ (или оперенными концами).
- З. Два главных вспомогательных белка, участвующие в механизме Ca^{2+} -регуляции в скелетных мышцах позвоночных — это _____ и _____.
- И. Наиболее «примитивные» мышцы, расположенные в тех участках тела, где требуются медленные и продолжительные сокращения, не имеют исчерченности и называются _____.
- К. Своевременное разъединение двух дочерних клеток при клеточном делении зависит от активности пучка из актиновых филаментов и молекул миозина, расположенного в виде пояса под плазматической мембраной и называемого _____.
- Л. Способные к сокращению организованные пучки из актиновых филаментов и миозина, являющиеся характерным компонентом культивируемых фибробластов, носят название _____.

11-2 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. У бактерий нет цитоскелета.
- Б. Мышечное сокращение — это результат скольжения толстых филаментов по тонким без изменения длины филаментов обоих типов.
- В. Для полимеризации актина необходим АТР, но не энергия его гидролиза.

- Г. Каждая молекула миозина состоит из четырех полипептидных цепей — двух тяжелых и двух легких.
- Д. В отсутствие актина миозин не может гидролизовать АТФ до АДФ и P_i .
- Е. Мышечное сокращение индуцируется повышением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , которые выбрасываются в цитозоль при открывании Ca^{2+} -каналов в саркоплазматическом ретикулуме.
- Ж. Мышечное сокращение прекращается, как только связанная мембраной Ca^{2+} -зависимая АТРаза снижает уровень АТФ.
- З. Тропонин I ингибирует взаимодействие миозина с актином, а тропонин С в присутствии Ca^{2+} снимает это ингибирование, позволяя миозину связываться с актином.
- И. В отличие от поперечнополосатых мышц сокращение гладких мышц вызывается Ca^{2+} -зависимым фосфорилированием одной из легких цепей миозина.
- К. Адреналин расслабляет гладкие мышцы, вызывая фосфорилирование киназы легких цепей миозина.
- Л. Нити напряжения представляют собой нечто вроде мельчайших миофибрилл, которые соединяют фокальные контакты на плазматической мембране друг с другом или с сетью промежуточных филаментов внутри клетки.
- М. Белые мышечные клетки приспособлены для сокращения в аэробных условиях, красные — для сокращения в анаэробных условиях.

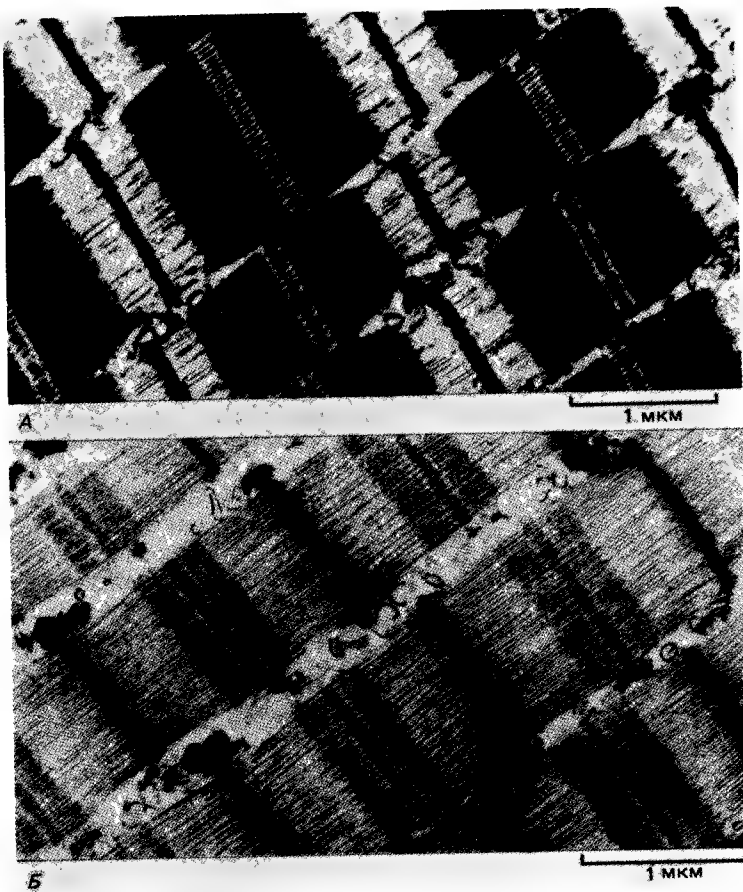


Рис. 11-1. Две электронные фотомикрографии продольного среза поперечнополосатой мышцы (задача 11-3). Фотографии сделаны с различными экспозициями. (С любезного разрешения Х. Хаксли.)

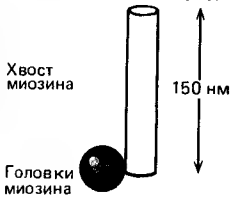
11-3 На рис. 11-1 показаны две электронные фотомикрографии поперечнополосатой мышцы в продольном разрезе. Саркомеры на этих фотографиях находятся в двух разных стадиях сокращения.

А. Определите, где на фотографии (рис. 11-1, А) расположены:

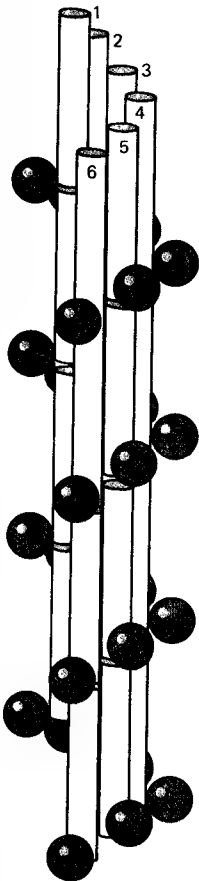
1. Темная полоса.
2. Светлая полоса.
3. Z-диск.
4. Миозиновые филаменты.
5. Актиновые филаменты (укажите плюс- и минус-концы).
6. α -актинин.
7. Миомезин.
8. Титин.

Б. Попробуйте найти все это на другой фотографии (рис. 11-1, Б). Будьте внимательны!

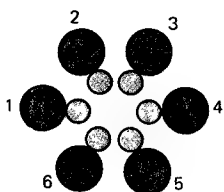
А. МОЛЕКУЛА МИОЗИНА



Б. СПИРАЛЬ МИОЗИНА



Вид сбоку



Вид сверху

11-4 Ничто лучше не иллюстрирует принципов сборки белков в ансамбли, чем строение мышц и организация цитоскелета. Молекулы белка, участок связывания которого комплементарен другому участку его собственной поверхности, могут самопроизвольно собираться в комплексы. Образующаяся структура в зависимости от геометрии и взаимного расположения комплементарных участков может быть либо кольцевой (простейший случай – димер), либо спиральной. Эти простые комплексы в свою очередь могут взаимодействовать друг с другом за счет все того же принципа комплементарного связывания, образуя более сложные структуры. Возникшие таким путем комплексы обладают свойством геометрической симметрии, которая вытекает из способа их построения. Вообще биологическая симметрия довольно проста для понимания, хотя многие и считают ее необъяснимой и даже несколько пугающей. Как бы то ни было, отмеченные принципы симметрии позволяют создать концептуальную основу для анализа биологических структур.

Рассмотрим в качестве примера толстый филамент миозина. Он представляет собою биполярную спиральную структуру, образованную одинаковыми субъединицами (палочкообразными молекулами миозина). Гексагональная упаковка актиновых и миозиновых филаментов в мышце указывает на то, что головки миозина, лежащие на поверхности спирали, должны совпадать с вершинами правильного шестиугольника – тогда их взаимодействие с актиновыми филаментами будет оптимальным. Этому требованию будет удовлетворять спираль, в которой на один виток приходится шесть миозиновых молекул (рис. 11-2, А), как показано на схеме (рис. 11-2, Б), где изображена половина биполярного толстого филамента. На самом деле миозиновые филаменты устроены более сложно – три цепи миозиновых молекул закручены вокруг друг друга, как жилы в канате; схема, приведенная на рис. 11-2, облегчает восприятие и иллюстрирует важные свойства реальной структуры.

Насколько хорошо эта упрощенная схема отображает свойства толстого филамента миозина?

А. Биполярная структура толстых филаментов с гладкой зоной посе-

Рис. 11-2. Схематическое изображение отдельной молекулы миозина (А) и спирали из миозиновых молекул (Б) (задача 11-4). Две головки миозина для простоты показаны как одно целое. Шесть молекул миозина, образующих первый виток спирали, пронумерованы.

- редине образуется в результате соединения двух спиралей миозина по способу «конец в конец» (верхний конец с верхним концом — см. рис. 11-2, Б). Могут ли действительно миозиновые спирали, подобные изображенным на рис. 11-2, соединяться таким образом? Будут ли соединяющиеся концы хорошо подогнаны друг к другу?
- Б. Какова протяженность гладкой зоны в соединенных спиральях? Предположите, что гладкая зона идет от первой головки миозина на одной спирали до первой головки миозина на противоположно ориентированной спирали.
- В. Как вы можете объяснить сужение, наблюдаемое на обоих концах толстого филамента миозина? (Это сужение хорошо демонстрирует фотомикрография в МБК, рис. 11-12.)
- Г. Толстые филаменты миозина поперечнополосатых мышц, как правило, совершенно одинаковы по длине, а гладкая зона расположена точно посередине каждого филамента. Обладает ли спираль, изображенная на рис. 11-2, каким-нибудь свойством, которое объяснило бы, почему длина у всех толстых филаментов одна и та же?

11-5 Выполняя лабораторное задание, вы вместе с товарищами проводите на изолированных мышечных волокнах опыты с новым соединением, называемым «заблокированный АТР» (фоточувствительный аналог АТР, который изначально активностью АТР не обладает, но под действием света разлагается с образованием свободного АТР — см. рис. 11-3). Поскольку такой заблокированный АТР не связывается с компонентами мышц, его можно добавлять к мышечным волокнам, не опасаясь вызвать сокращение. Спустя некоторое время можно индуцировать расщепление заблокированного АТР при помощи лазерного импульса и вызвать этим мгновенное освобождение АТР сразу во всем мышечном волокне.

Вначале вы обрабатываете изолированное волокно поперечнополосатой мышцы глицеролом, чтобы сделать его проницаемым для нуклеотидов. Затем в буфере, содержащем АТР, вы помещаете

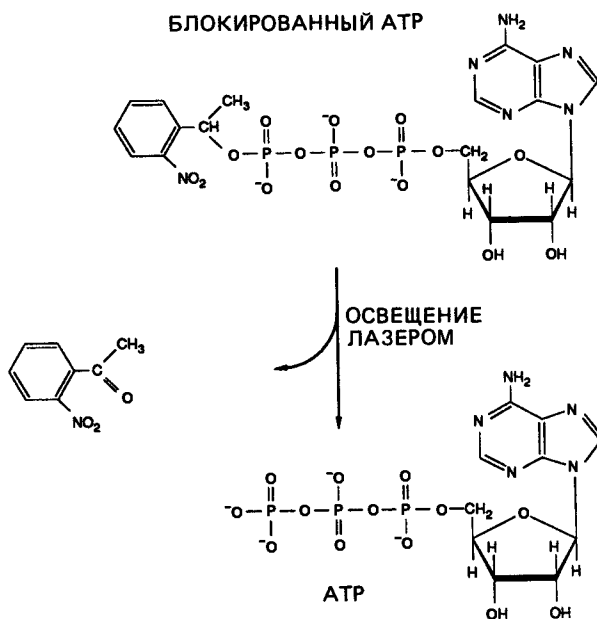


Рис. 11-3. Блокированный АТР (задача 11-5).

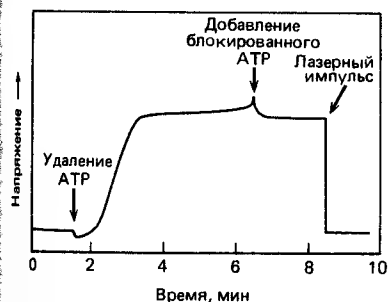


Рис. 11-4. Напряжение, создающееся в поперечнополосатом мышечном волокне при различных экспериментальных воздействиях (задача 11-5).

его в аппарат, позволяющий измерять напряжение в волокне при его сокращении. Как показано на рис. 11-4, вы измеряете напряжение, возникающее под влиянием ряда экспериментальных воздействий: удаления АТР путем разбавления, добавки заблокированного АТР и его активации (расщепления) лазерным излучением. Полученные результаты приводят вас в замешательство, так как они сильно отличаются от полученных всеми остальными студентами. Проверая протокол вашего эксперимента, вы обнаруживаете, что забыли добавить в буфер Ca^{2+} . Преподаватель говорит вам, что на самом деле ваш эксперимент может служить хорошим контролем для остальной группы, но чтобы получить зачет, вам следует ответить на несколько вопросов и показать понимание предмета.

- А. Почему АТР в омывающем буфере не вызывал сокращения мышечного волокна?
- Б. Почему при последующем удалении АТР возникло напряжение? Почему это напряжение развивалось так постепенно? (Если бы нашим мышцам для каждого акта сокращения требовалось по целой минуте, мы все двигались бы очень медленно.)
- В. Почему воздействие лазерным излучением на волокно, содержащее заблокированный АТР, вызвало расслабление?

11-6 Изменение длины саркомера в процессе сокращения мышцы — это одно из ключевых наблюдений, на которых строится модель скользящих нитей. С изменением длины саркомера величина напряжения, создаваемого мышечным волокном, также меняется согласно этой модели. Соотношение между длиной саркомера и напряжением, развиваемым поперечнополосатой мышцей при изометрическом сокращении, показано в виде диаграммы на рис. 11-5. В этой мышце длина миозиновых филаментов составляет 1,6 мкм, а длина актиновых тонких филаментов (считая от Z-диска) — 1,0 мкм.

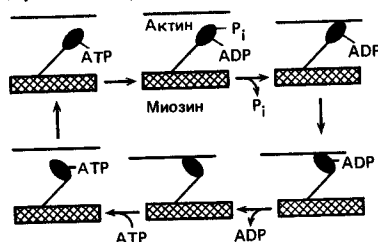
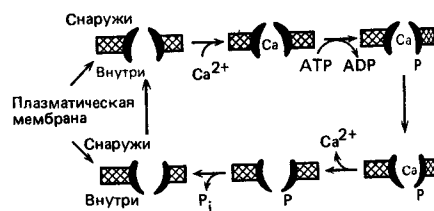
Исходя из модели скользящих филаментов и зная структуру саркомера, предложите свое объяснение (на молекулярном уровне) связи между длиной саркомера и создаваемым напряжением на каждом из отрезков (I, II, III, IV) графика на рис. 11-5.

11-7 В живых организмах постоянно происходит превращение свободной химической энергии в движение. Сокращение мышц, биение ресничек, ток цитоплазмы, деление клеток и активный транспорт — все это примеры способности клеток переводить свободную химическую энергию в механическую работу. Во всех этих случаях белковый «мотор» использует освобождаемую в химической реакции свободную энергию для перемещения связанной с ним моле-



Рис. 11-5. Напряжение как функция длины саркомера при изометрическом сокращении (задача 11-6).

Рис. 11-6. Превращение свободной химической энергии в механическую работу (задача 11-7). **А.** Скольжение актиновых филаментов относительно миозиновых. **Б.** Активный транспорт Ca^{2+} из клетки во внешнее пространство. Стрелки в каждом цикле нарисованы лишь в одном направлении — в соответствии с прямой реакцией (нормальная работа). Стадии фосфорилирования и дефосфорилирования в цикле активного транспорта катализируются ферментами, которые на схеме не изображены.

А. СКОЛЬЗЯЩИЙ ФИЛАМЕНТ**Б. АКТИВНЫЙ ТРАНСПОРТ**

кулы (лиганда) в определенном направлении. Анализ превращений свободной энергии в некоторых (наиболее изученных) биологических системах позволяет предположить, что они происходят в соответствии со следующими принципами.

1. Для превращения свободной химической энергии в механическую работу используется цикл реакций.
2. На некотором этапе цикла лиганд прочно связывается с белковым «мотором».
3. На каком-то этапе цикла «мотор» претерпевает крупное конформационное изменение, в результате чего и происходит физическое перемещение лиганда.
4. На каком-то этапе цикла константа связывания лиганда сильно уменьшается, что позволяет лиганду отделиться от «мотора».

Эти принципы иллюстрируются двумя примерами превращения свободной энергии, которые показаны на рис. 11-6: 1) скольжение относительно друг друга актиновых и миозиновых филаментов и 2) активный транспорт Ca^{2+} из клетки, где его концентрация низка, во внешнюю среду, где его концентрация высока. При рассмотрении этих циклов хорошо выявляются принципы превращения свободной энергии.

- А. Каков источник свободной химической энергии для осуществления этих циклов и какая в каждом цикле совершается механическая работа?
- Б. Что является в каждом из циклов тем лигандом, который прочно связывается, а потом освобождается? Укажите этапы, где лиганд прочно связан.
- В. Какие конформационные изменения в белке-«моторе» создают «рабочий ход», а какие «возвратный ход» в каждом цикле?

Актиновые филаменты и клеточный кортекс (МБК 11.2)

11-8 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Густая сеть актиновых филаментов и связанных с ними белков, находящаяся непосредственно под плазматической мембраной клетки, образует _____.
- Б. Среди белков, образующих поперечные сшивки между актиновыми филаментами, обычно преобладает _____, который представляет собой длинную гибкую молекулу, состоящую из двух одинаковых полипептидных цепей.
- В. Среди белков, способных разжижать гели актина в присутствии Ca^{2+} , лучше всего изучен _____, который разрезает актиновую цепь и образует «шапочку» на плюс-конце (экспонирует его).
- Г. В растительных клетках по причине их больших размеров и жесткости стенок должен существовать мощный _____, обеспечивающий ее эффективное перемешивание.

- Д. Пальцевидные выросты, имеющиеся на поверхности многих животных клеток, называются _____.
- Е. Специализированный кортекс в апикальной части эпителиальных клеток кишечника носит название _____; он представляет собой густую сеть из молекул спектрина, расположенную поверх слоя промежуточных филаментов.
- Ж. Клетки прикрепляются к субстрату с помощью специальных структур, называемых _____, эти структуры служат точками прикрепления к плазматической мембране нитей напряжения.
- З. Процесс непрерывного переноса мономеров актина от одного конца тонкого филамента к другому называется _____.
- И. Клетки, растущие в культуре, часто образуют тонкие выросты — _____, имеющие ширину около 0,1 мкм и длину 5–10 мкм.
- К. На переднем крае ползущих клеток и конусов роста время от времени образуются тонкие листовидные выступы, называемые _____.

11-9 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Гели, состоящие из актина и сшивающих его белков (например, филамина), устойчивы к внезапным воздействиям, но легко деформируются, если к ним приложены медленно и продолжительно действующие силы.
- Б. Миозин в немышечных клетках необходим для сокращения и для создания тока цитоплазмы.
- В. Ток цитоплазмы у *Nitella*, вероятно, осуществляется с участием слоя поляризованных микротрубочек, лежащего непосредственно под неподвижным монослоем хлоропластов.
- Г. В зрелых эритроцитах актиновые филаменты соединены непосредственно с мембраной.
- Д. Актиновые филаменты, образующие сердцевину микроворсинки, жестко соединены между собой специальными связывающими актин белками, в том числе фимбрином и фасцином.
- Е. Так называемая критическая концентрация актина — это концентрация, необходимая для инициирования стадии нуклеации, предшествующей полимеризации.
- Ж. Тредмиллинг актиновых филаментов происходит за счет энергии гидролиза АТФ.
- З. Удлинение акросомального отростка (акросомальная реакция) у спермиев некоторых беспозвоночных происходит в результате быстрой полимеризации накопившихся мономеров актина.
- И. Регуляция сборки актина в филаменты осуществляется на уровне создания на плазматической мембране участков нуклеации для роста актиновых филаментов.
- К. Цитохалазин нарушает расхождение хромосом в митозе, что указывает на участие в этом процессе актина.

11-10 АТФ выполняет двоякую роль в сокращении терминальной сети, контролирующей подвижность микроворсинок на поверхности кишечного эпителия. Две функции АТФ были выявлены с помощью аналогов АТФ — АТФ- γ -S и инозинтрифосфата (ITP), структурные отличия которых от АТФ показаны на рис. 11-7 стрелками. На выделенных из кишечного эпителия мембранах, содержащих микроворсинки и связанную с ними терминальную сеть, были проведены эксперименты двух типов. В одном случае препарат клеточных мембран вначале преинкубировали с АТФ- γ -S или без него в присутствии Ca^{2+} , а затем добавляли

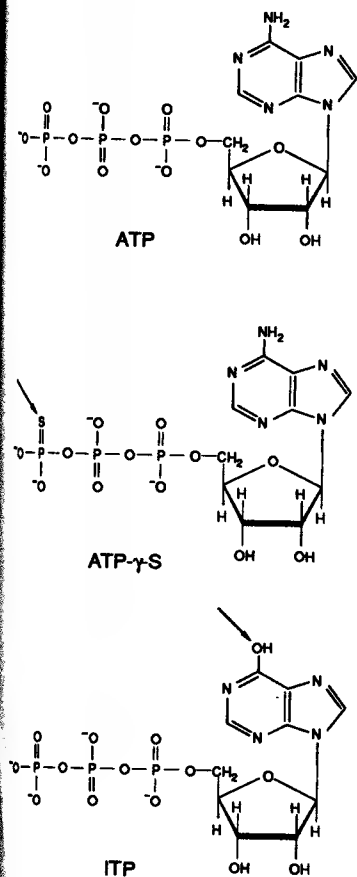


Рис. 11-7. АТФ и два его аналога — АТФ- γ -S и ITP (задача 11-10).

Таблица 11-1. Использование аналогов АТФ для изучения сокращения терминальной сети в мембранах из клеток кишечника (задача 11-10)

Эксперимент	Предынкубация	Инкубация	Сокращение
1	Без аналога	АТФ	Есть
2	Без аналога	ИТР	Нет
3	Без аналога	АТФ- γ -S	Нет
4	АТФ- γ -S	АТФ	Есть
5	АТФ- γ -S	ИТР	Есть
6	АТФ- γ -S	АТФ- γ -S	Нет

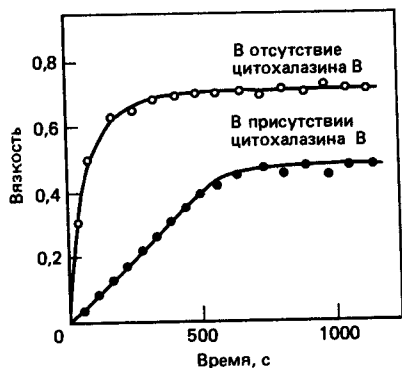


Рис. 11-8. Увеличение вязкости растворов актина в присутствии и в отсутствие цитохалазина В (задача 11-11).

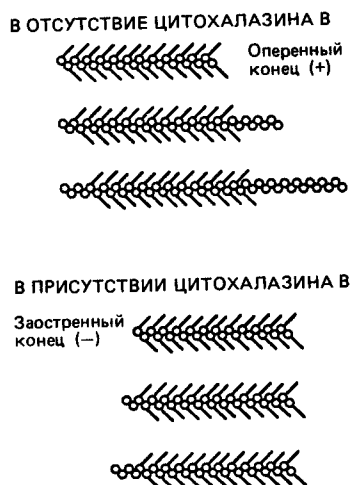


Рис. 11-9. Вид типичных актиновых филаментов, образовавшихся в присутствии и в отсутствие цитохалазина В (задача 11-11). Вверху показаны декорированные актиновые филаменты перед добавлением мономеров актина; ниже изображены филаменты, образовавшиеся в течение разных промежутков времени после их добавления.

АТФ, ИТР или АТФ- γ -S и регистрировали сокращение терминальной сети (табл. 11-1). Во втором случае мембраны инкубировали с мечеными аналогами АТФ и определяли, какие белки при этом фосфорилируются. Оказалось, что легкая цепь миозина подвергается фосфорилированию в присутствии АТФ- γ - 32 P и АТФ- γ - 35 S, но не в присутствии ИТР- γ - 32 P.

- Какова двойная роль гидролиза АТФ в сокращении терминальной сети? В какой из функций АТФ можно заменить на АТФ- γ -S? В какой — на ИТР?
- Обе рассматриваемые функции АТФ зависят от гидролиза концевой (γ) фосфодиэфирной связи. Чем объяснить тот факт, что в двух описанных типах экспериментов аналоги АТФ ведут себя по-разному?

11-11

Цитохалазин В — это мощный ингибитор некоторых форм клеточной подвижности, таких, как цитокинез и продвижение кончиков растущих аксонов; он резко уменьшает вязкость гелей, образуемых смесями актина с различными актин-связывающими белками. На основании этих наблюдений можно предположить, что цитохалазин влияет на процесс сборки актиновых филаментов; он, однако, не связывается с мономерным актином. Каким же образом он оказывает свое действие на подвижность?

Рассмотрим следующий эксперимент. Короткие актиновые филаменты были декорированы миозиновыми головками, и затем в присутствии цитохалазина В или в его отсутствие к ним был добавлен мономерный актин. За процессом сборки актиновых филаментов следили, измеряя вязкость раствора (рис. 11-8) и исследуя пробы с помощью электронного микроскопа (рис. 11-9).

- Что можно сказать о характере сборки актиновых филаментов в нормальных условиях на основании электронно-микроскопических данных?
- Предложите объяснение того, каким образом цитохалазин В ингибирует сборку актиновых филаментов. Дайте трактовку данным вискозиметрии и внешнего вида филаментов на электронных фотомикрографиях.
- Судя по параметрам сборки актиновых филаментов в норме и актин-связывающим свойствам цитохалазина В, мономер актина, присоединяясь к филаменту, меняют свою конформацию. На основании каких данных сделан этот вывод?

11-12

Ваша конечная цель — объяснить феномен человеческого сознания, а преподаватель хочет, чтобы в качестве первого шага

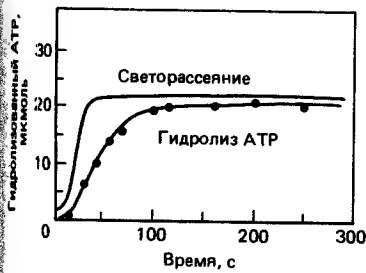


Рис. 11-10. Кинетика полимеризации актина и гидролиза АТФ (задача 11-12).

разобрались в некоторых основных моментах сборки мономеров актина в филаменты. Преподаватель говорит вам, что АТФ связывается с мономерами актина и необходим для процесса сборки, но при этом гидролиз АТФ для полимеризации необязателен, ибо в определенных условиях АТФ можно заменить на АДФ. Однако филаменты, образовавшиеся в присутствии АДФ, гораздо менее стабильны, чем филаменты, образовавшиеся в присутствии АТФ, и это вызывает у вас тайное подозрение, что на самом деле при сборке актиновых филаментов используется свободная энергия гидролиза АТФ.

Преподаватель предлагает вам тщательно измерить количественное соотношение между числом гидролизованных молекул АТФ и числом мономеров актина, соединившихся в полимер. Эксперимент включает следующие этапы. Для измерения гидролиза АТФ вы добавляете в раствор полимеризующегося актина АТФ- γ - ^{32}P , после чего отбираете через короткие промежутки времени пробы и определяете в них количество образовавшегося неорганического фосфата. Чтобы измерить полимеризацию, вы с помощью спектрофотометра следите за увеличением светорассеяния, которым сопровождается образование актиновых филаментов. Ваши результаты изображены на рис. 11-10. Из данных по измерению светорассеяния следует, что полимеризовалось 20 мкмоль мономеров актина. Поскольку количество мономеров актина в составе полимеров в точности совпадает с количеством гидролизованных молекул АТФ, вы делаете заключение, что присоединение к актиновому филаменту каждого нового мономера сопровождается гидролизом одной молекулы АТФ.

Когда вы показываете результаты преподавателю и сообщаете ему свои выводы, он улыбается и очень мягко указывает вам, что нужно посмотреть на график более внимательно. По его мнению, ваши данные подтверждают способность актина полимеризоваться без гидролиза АТФ.

- А. Что преподаватель увидел в этих данных, а вы не заметили?
- Б. Что можно сказать на основе ваших данных о распределении АТФ и АДФ в полимеризующихся актиновых филаментах?

11-13 Один из самых поразительных примеров «чисто актиновой» подвижности клеток — это акросомальная реакция спермия голотурии. В головке спермия содержится запас неполимеризованного актина. Когда спермий вступает в контакт с яйцом, этот актин быстро полимеризуется, образуя длинное стреловидное выпячивание (акросомальный отросток). Конец этого акросомального отростка проникает в яйцо и, возможно, используется также для «втаскивания» внутрь самого спермия.

Где новые мономеры актина присоединяются к акросомальному пучку актиновых филаментов во время удлинения отростка — в основании пучка или на его конце? Если доставка мономеров к месту сборки определяется диффузией, то этот вопрос можно решить, измеряя длину акросомального отростка в зависимости от времени. В самом деле, если присоединение новых мономеров актина к растущим филаментам происходит у основания отростка (которое находится внутри головки), то зависимость длины от времени должна быть линейной, так как расстояние от источника мономеров до места сборки не меняется. Если же новые субъединицы «добавляются» на вершине отростка, то скорость его роста по мере удлинения должна

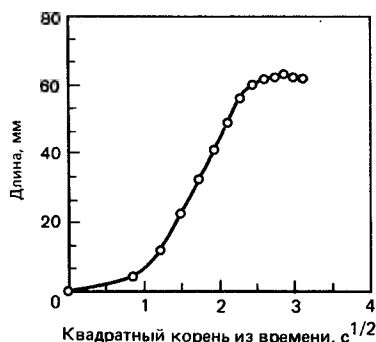
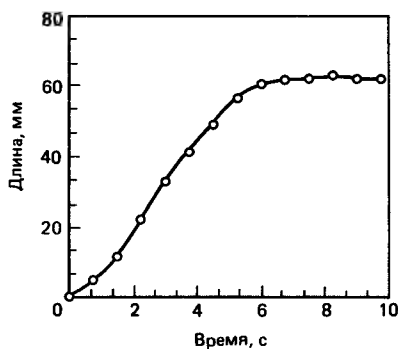


Рис. 11-11. Графики длины акросомы как функции времени и как функции квадратного корня из времени (задача 11-13).

прогрессивно падать: мономерам, чтобы присоединиться к филаментам, нужно будет преодолевать все большее расстояние всю длину отростка. В этом случае скорость удлинения после него будет пропорциональна квадратному корню из времени. Графики зависимости длины акросомального отростка от времени и от квадратного корня из времени представлены на рис. 11-11.

- А. С чем лучше согласуется восходящий участок кривой на рисунке 11-11 – с предположением о присоединении актиновых мономеров у основания акросомального отростка или с предположением о присоединении их на конце отростка?
- Б. Почему самое медленное удлинение наблюдается именно в начале и в конце акросомальной реакции?

Движение ресничек (МБК 11.3)

11-14 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. _____ – это волосковидные выросты на клеточной поверхности; они образованы микротрубочками и движутся как миниатюрные хлысты.
- Б. Сперматозоиды движутся с помощью _____ – длинного тонкого выроста, по которому распространяются квазисинусоидальные волны.
- В. Сердцевина реснички – это сложная структура, называемая _____, которая целиком построена из микротрубочек и ассоциированных с ними белков.
- Г. Микротрубочка состоит из молекул _____.
- Д. Белковый комплекс, который отвечает за скольжение периферических дублетов микротрубочек относительно друг друга (благодаря чему ресничка изгибается), называется _____.
- Е. В базальных тельцах находятся _____ – небольшие цилиндрические органеллы, состоящие из девяти групп слившихся по три микротрубочек.
- Ж. _____, называемая также клеточным центром, служит «организатором» микротрубочек в цитоплазме во время интерфазы.

11-15 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие – нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. У эукариот реснички и жгутики содержат периферическое кольцо из девяти дублетов микротрубочек, окружающее две одионарные микротрубочки.
- Б. Микротрубочки почти целиком состоят из большого числа субъединиц, двух типов, представленных незначительно различающимися между собой полипептидными цепями.
- В. Движение ресничек катализируется миозином, который образует набор ручек, соединяющих соседние периферические дублеты в кольцо.
- Г. Изгибающее усилие, заставляющее ресничку двигаться, возникает при смещении пары центральных микротрубочек относительно периферического кольца из дублетов микротрубочек.
- Д. Если нексиновые связи в изолированной аксонеме «разрезаны» путем мягкой обработки протеазами, то при добавлении АТФ в низкой концентрации периферические дублеты начинают выдвигаться из аксонемы.

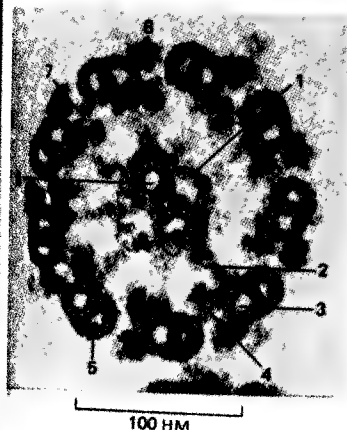


Рис. 11-12. Электронная фото-микрография поперечного среза жгутика *Chlamydomonas reinhardtii* (задача 11-16). (С любезного разрешения Л. Тилни.)

- Е. Организованное биение ресничек контролируется потоками ионов Ca^{2+} через их мембрану.
- Ж. Мутантные жгутики, у которых отсутствует центральная пара микротрубочек, не способны двигаться, однако дополнительные мутации, влияющие на наружные динеиновые ручки, могут восстановить эту способность.
- З. Синдром Картагенера у *Chlamydomonas*, вызванный неподвижностью жгутиков, включает целый ряд нарушений.
- И. Хотя у центриолей и отсутствует центральная пара микротрубочек, они, по-видимому, служат центрами нуклеации для роста аксоном.
- К. В центросомах обычно содержатся центриоли.
- Л. Центриоли в норме не возникают de novo, однако в некоторых клетках при определенных условиях возможна индукция их образования.

11-16 На рис. 11-12 представлена электронная фото-микрография поперечного среза жгутика.

- А. Укажите, каким цифрам на рисунке соответствуют следующие компоненты.

Субфибрилла А	Центральная капсула
Субфибрилла В	Нексин
Наружная динеиновая ручка	Радиальная спица
Внутренняя динеиновая ручка	Одиночная микротрубочка

- Б. Какие из этих структур построены из тубулина?

- В. Есть ли здесь структуры (и если есть, то какие), образующие единое целое с компонентами базального тельца?

11-17 У снабженных ресничками клеток биение индивидуальных ресничек обычно скоординировано так, что все они движутся в одном направлении (в одной плоскости), сообщая тем самым однонаправленное движение самой клетке или окружающей ее жидкости. В принципе такая координация может достигаться либо за счет особенностей структуры самих ресничек, либо с помощью специального клеточного механизма, деятельность которого от строения ресничек не зависит.

На рис. 11-13 показана электронная фото-микрография поперечного среза кортекса *Tetrahymena* — ресничной инфузории. Плоскость среза проходит через поверхность клетки по касательной, так что на последовательных сечениях ресничек можно проследить переход структуры типа «9 + 2» в аксономе в девять триплетов микротрубочек, свойственных базальному тельцу. Есть ли на этой фотографии какие-то детали, которые помогли бы решить вопрос о том, что лежит в основе *однонаправленного* биения соседних ресничек — структура аксономы или регуляция со стороны клетки? Объясните свой ответ.

Рис. 11-13. Электронная фото-микрография среза через кортекс ресничной инфузории *Tetrahymena* (задача 11-17). (С любезного разрешения К. Робертс.)

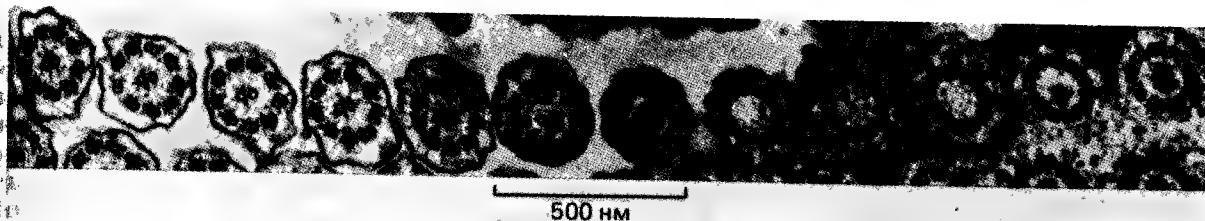
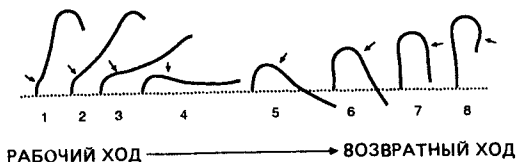


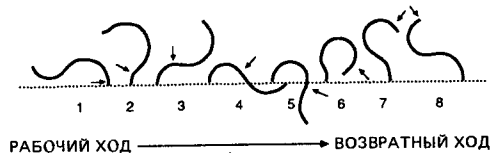
Рис. 11-14. Циклы биения жгутика у *Chlamydomonas* (задача 11-18).

А. Дикий тип. Б. Мутант. Картины биения жгутиков, показанные слева, получаются при фотографировании под микроскопом со стробоскопическим освещением. Справа эти две картины разложены на ряд последовательных стадий цикла. Стрелки указывают на переднюю границу изогнутого участка, бегущего по жгутику от его основания к концу.

А. ДИКИЙ ТИП



Б. МУТАНТ



11-18

При детальном анализе можно обнаружить, что ритмичное биение жгутика представляет собой серию точно повторяющихся движений. Цикл биения жгутика у *Chlamydomonas* просто и выглядит как показано на рис. 11-14, А. Вначале совершается рабочий ход, начинающийся изгибом у основания жгутика (стрелка у основания жгутика на рис. 11-14, А). Заканчивается рабочий ход в тот момент, когда изогнутый участок жгутика образует полукольцо (жгутик №5 на рис. 11-14, А). При возвратном ходе положение изогнутого полукольцом сегмента перемещается от основания жгутика к его концу за счет того, что передний край сегмента изгибается все сильнее, а задний край расслабляется (жгутики 6–8 на рис. 11-14, А). Любая модель, претендующая на полное описание молекулярного механизма работы аксонемы, должна объяснить эти макродвижения жгутика.

- А. Сколь сильно должны смещаться друг относительно друга дубликаты микротрубочек, чтобы получился наблюдаемый изгиб жгутика в полукольцо? Рассчитайте, на какое расстояние внутренний дублет полукольца выдвинется на конце жгутика относительно наружного дублета (рис. 11-15, А).
- Б. При изгибе жгутика в полукольцо эластичная молекула нексина, которая соединяет соседние периферические дубликаты, должна растягиваться. Если длина нерастянутой молекулы нексина в основании жгутика составляет 30 нм, до какой длины она растягивается на его конце (рис. 11-15, Б)?
- В. У мутантов *Chlamydomonas*, лишенных радиальных спиц, жгутик парализован. Этот паралич исчезает, если происходят мутации в другом гене (он называется *sup_{pf}*, от *suppressor of paralyzed flagella*), кодирующем компонент наружной ручки динеина. В этом случае жгутик вновь способен двигаться, но характер биения оказывается искаженным (рис. 11-14, Б). Чем (на уровне механики) различаются циклы биений у мутантного штамма и у штамма дикого типа? Что можно сказать на основании этого различия о функциях радиальных спиц у *Chlamydomonas*?

11-19

Механизм скольжения микротрубочек, без сомнения, верно объясняет изгибание ресничек. Результат скольжения совершенно ясен, если рассматривать пару периферических дублетов изолированно. Однако довольно трудно представить себе, как должно выглядеть это скольжение в цилиндрическом пучке периферических дублетов аксонемы. Ручки динеина расположены таким образом, что при активации они толкают соседние

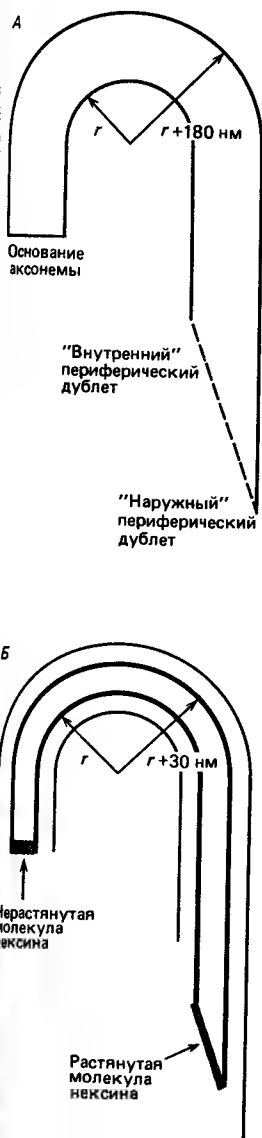


рис. 11-15. Жгутик, изогнувшийся до полукольца (задача 11-18). Изображение «внутреннего» и «наружного» периферических дублетов, отстоящих друг от друга на 180 нм. Б. Изображение соседних дублетов, отстоящих друг от друга на 30 нм, и соединяющих их молекула нексина.

дублет в направлении конца реснички. В цилиндрическом пучке, если все динеиновые ручки будут одинаково активны, никакое движение произойти не сможет (эта ситуация напоминает вставших в кружок силачей, каждый из которых пытается оторвать своего соседа от земли; если бы им всем это удалось, они бы взлетели).

Предложите такое распределение активности динеина (согласующееся со строением аксономы и направленностью работы ручек), при котором аксонома могла бы изгибаться в одном направлении. Как должно измениться это распределение, чтобы произошел изгиб в противоположном направлении?

11-20

Аксонома реснички, состоящая более чем из двухсот различных белков, устроена чрезвычайно сложно. Структуру аксономы очень удобно изучать на одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, клетки которой несут по два жгутика. На ней легко проводить физиологические и микроскопические наблюдения, и что еще более важно, на ней легко проводить генетический и биохимический анализ. В частности, очень просто выделить мутантов с парализованными жгутиками, благодаря тому, что они неподвижны. С помощью методов скрещивания можно идентифицировать гены, в которых произошли мутации. Наконец, жгутики у клеток дикого типа и мутантов легко отделяются (например, в результате рН-шока) и их можно получить в виде высокоочищенных препаратов, чтобы исследовать биохимическими методами.

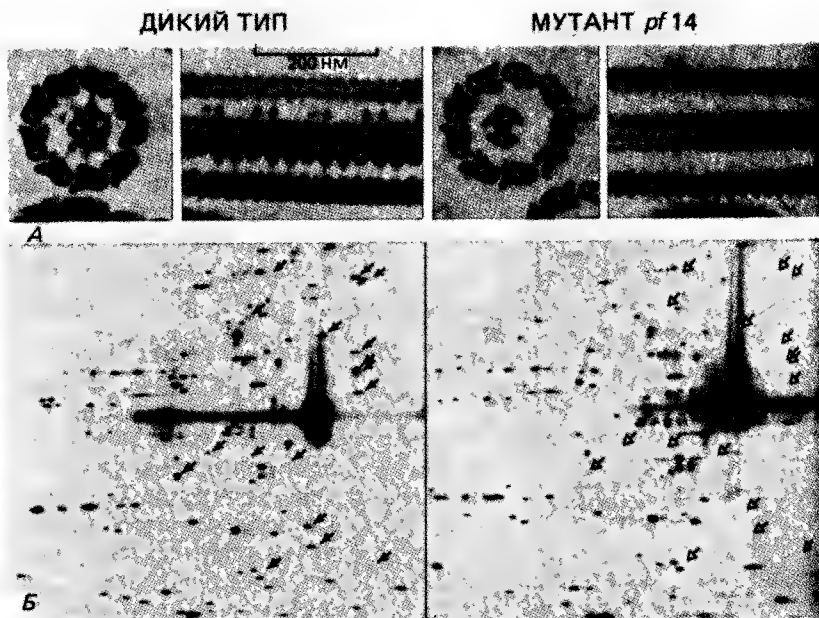
Мутанты с парализованными жгутиками обычно лишены тех или иных существенных компонентов аксономы, таких как радиальные спицы, наружные динеиновые ручки, внутренние динеиновые ручки, одна или обе центральные микротрубочки. В большинстве случаев потеря элементов структуры аксономы вызвана мутацией, затрагивающей только один ген, но тем не менее при биохимическом анализе обнаруживается, что в дефектной аксономе недостает многих белков. Рассмотрим, например, мутант *pf14* (от *paralyzed flagella*): электронные фотомикрографии показывают, что он полностью лишен радиальных спиц (рис. 11-16, А), а при анализе белков жгутика с помощью двумерного электрофореза выявляется отсутствие 17 различных белков (рис. 11-16, Б).

Исчезновение многих белков в результате дефекта в одном гене можно объяснить двумя путями: 1) дефект присутствует в регуляторном гене, который контролирует синтез исчезающих белков; 2) дефект содержится в гене, продукт которого в норме должен присутствовать в структуре до того, как в нее включаются другие белки. Для проверки этих возможностей было использовано два подхода.

- А. Первый подход основан на особенности цикла спаривания у *Chlamydomonas*. В ходе спаривания происходит слияние двух жгутиковых гамет, и временно образуется популяция дикарионов, несущих четыре жгутика. При спаривании гамет *pf14* с гаметами дикого типа парализованные жгутики после слияния начинают функционировать, что указывает на возможность восстановления дефектных структур и без их полной перестройки. (В нормальных клетках есть запас компонентов, достаточный для построения нового целого жгутика даже в отсутствие синтеза белка.) Чтобы выяснить, какой из возможных дефектов жгутиков имеет место, исследователи поместили мутантные

Рис. 11-16. Сопоставление жгутиков из *Chlamydomonas* дикого типа и из мутанта *pf14* (задача 11-20).

А. Электронные фотомикрографии поперечных и продольных срезов жгутиков. Обратите внимание на отсутствие радиальных спиц у мутанта *pf14*. **Б.** Анализ жгутиков с помощью двумерного электрофореза. Первое направление (горизонтальное) – разделение по изоэлектрической точке (изоэлектрическое фокусирование), более кислые белки расположены справа; второе направление – разделение по мол. массе (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия). Стрелки указывают положение белков, которые есть в жгутиках клеток дикого типа, но отсутствуют в жгутиках мутанта *pf14*. Сильно экспонированные области соответствуют α - и β -тубулинам, количество которых в аксонеме несравнимо больше количества всех прочих белков. (По G. Piperno, B. Huang, Z. Ramanis, and D. Luck, J. Cell Biol. 88: 73–79, 1981. Перепечатано с разрешения Rockefeller University Press.)



клетки изотопом $^{35}\text{SO}_4$, добавив его в среду для роста, и затем индуцировали слияние меченых гамет мутанта с немечеными гаметами дикого типа (в присутствии ингибиторов белкового синтеза). Жгутики после восстановления их функции выделили, и радиоактивные белки проанализировали с помощью двумерного электрофореза с последующей радиоавтографией.

Предположите, какой должна была быть электрофоретическая картина радиоактивных белков жгутика дикариона, если поврежденный ген контролировал синтез исчезнувших белков. Чем она должна была отличаться от картины электрофоретического распределения для случая, если продукт дефектного гена участвует в сборке жгутиковых структур?

Б. Второй подход состоял в обработке мутанта *pf14* мутагеном и поиске ревертантов, у которых функция жгутика восстановлена не из-за исправления исходного дефекта, а в результате вторичного изменения в том же гене, компенсирующего первоначальное. (Для некоторых генов такие внутригенные ревертанты могут быть довольно обычным явлением.) Белки из нескольких таких ревертантов проанализировали с помощью двумерного электрофореза и сравнили с белками из клеток дикого типа.

Каким образом этот подход позволяет выбрать одно из двух возможных объяснений дефекта жгутика у *pf14*?

Микротрубочки цитоплазмы (МБК 11.4)

11-21 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- Алкалоид _____ прочно связывается с тубулином, препятствуя его полимеризации.
- Минус-концы микротрубочек скрыты в _____, который служит центром образования звезды.
- Микротрубочки в клетках обладают свойством _____, оно выражается в том, что индивидуальные микротрубочки во

А. в

Масса микротрубочек
40
30
20
10
0

Б. в п

Число микротрубочек
60
50
40
30
20
10
0

Рис. 1
бочек
ствии
конце
11-23)
димер
субъе

время то равномерно растут, то быстро деполимеризуются.

- Г. В функции _____ входят стабилизация микротрубочек для предотвращения их распада и обеспечение их взаимодействия с другими компонентами клетки.
- Д. Крупный белковый комплекс, называемый _____, перемещает везикулы вдоль аксональных микротрубочек в одном направлении — из тела клетки к концу аксона.

11-22 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

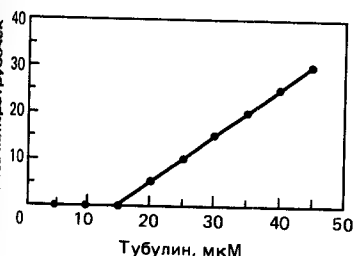
- А. Микротрубочки ответственны за регуляцию полярности клетки, за форму клетки, за подвижность, и, кроме того, они определяют плоскость, в которой происходит деление клетки.
- Б. Добавленный к растущим в культуре клеткам колхицин за несколько минут блокирует все их на стадии митоза.
- В. Таксол стабилизирует микротрубочки.
- Г. Быстрорастущие концы микротрубочек всегда направлены от полюса веретена.
- Д. Для полимеризации тубулина требуется GTP.
- Е. Все микротрубочки, в том числе в ресничках и жгутиках, обнаруживают динамическую нестабильность.
- Ж. Переход микротрубочек в более устойчивые формы, сохраняющие интактность даже после обработки клеток колхицином, происходит при отщеплении тирозина и/или ацетилировании.
- З. Тубулин подвергается посттрансляционным модификациям только в состоянии свободного димера (но не в составе полимера).
- И. Чтобы обеспечить движение везикул и органелл по аксону нервной клетки в обе стороны, микротрубочки в аксоне также ориентированы в обоих направлениях.
- К. Очищенный кинезин перемещает везикулы по микротрубочкам только в одном направлении.

11-23 Принято считать, что функции микротрубочек зависят от специфической пространственной организации их внутри клетки. Как же создается это пространственное распределение и чем определяется образование или исчезновение индивидуальных микротрубочек?

Для ответа на эти вопросы исследовали сборку тубулина в микротрубочки *in vitro*. При концентрациях тубулина ниже 15 мкМ образования микротрубочек не происходило, но при более высоких концентрациях они интенсивно формировались (рис. 11-17, А). Если к раствору тубулина добавляли центросомы, микротрубочки начинали образовываться при концентрации ниже 5 мкМ (рис. 11-17, Б). (В этих двух экспериментах использовали различные методы измерения — по общему весу микротрубочек (рис. 11-17, А) и по числу микротрубочек на одну центросому (рис. 11-17, Б), но определяемое снижение критической концентрации сборки микротрубочек в присутствии центросом не зависело от метода измерения.)

- А. Как вы думаете, почему концентрация, при которой начинается образование микротрубочек (критическая концентрация) различна в этих двух экспериментах?
- Б. Почему кривая на рис. 11-17, А в области концентраций тубулина выше 15 мкМ имеет линейно растущий участок, а кривая на рис. 11-17, Б в области концентраций около 25 мкМ достигает плато?

А. В ОТСУТСТВИИ ЦЕНТРОСОМ



Б. В ПРИСУТСТВИИ ЦЕНТРОСОМ

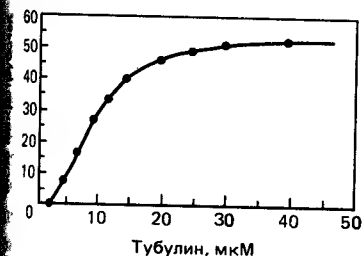


рис. 11-17. Образование микротрубочек в отсутствие (А) и в присутствии (Б) центросом как функция концентрации тубулина (задача 11-23). Концентрация указана для димеров тубулина, служащих единицами при сборке.

В. В обычной клетке концентрация тубулиновых димеров (именно они являются «элементарными сборочными субъединицами») составляет 1 мг/мл, а молекулярная масса димера тубулина – 110 кДа. Какова молярная концентрация тубулина в клетке? Как она соотносится с критической концентрацией в двух описанных экспериментах? Какое это имеет значение для процесса сборки микротрубочек в клетке?

11-24

Помимо centrosом, центрами нуклеации для сборки микротрубочек могут служить аксоны жгутиков и кинетохоры. Каким концом (плюс- или минус-) возникающая микротрубочка связана с этими структурами в точке нуклеации? Чтобы определить, какой конец микротрубочек присоединен к centrosомам и кинетохорам, был поставлен следующий эксперимент. В качестве контроля были взяты аксоны жгутиков, потому что их плюс- и минус-концы можно различить. Кинетохоры, centrosомы и аксоны инкубировали в течение короткого промежутка времени с немеченым тубулином, чтобы вызвать нуклеацию и рост микротрубочек. Затем был добавлен в высокой концентрации тубулин, помеченный биотином, и инкубация продолжалась еще 10 мин. По прошествии этого времени препараты фиксировали и содержащие биотин сегменты выявляли с помощью меченных флуоресцеином антител к биотину. Измеряли длину меченных биотином сегментов и строили графики распределения микротрубочек по длине (рис. 11-18).

- Какой конец вновь образованной микротрубочки прикрепляется к плюс-концу аксоны жгутика?
- Какой конец образованной на аксоне микротрубочки растет быстрее?
- Какой конец собранной микротрубочки присоединен к centrosоме? К кинетохоре? Объясните ваш ответ.

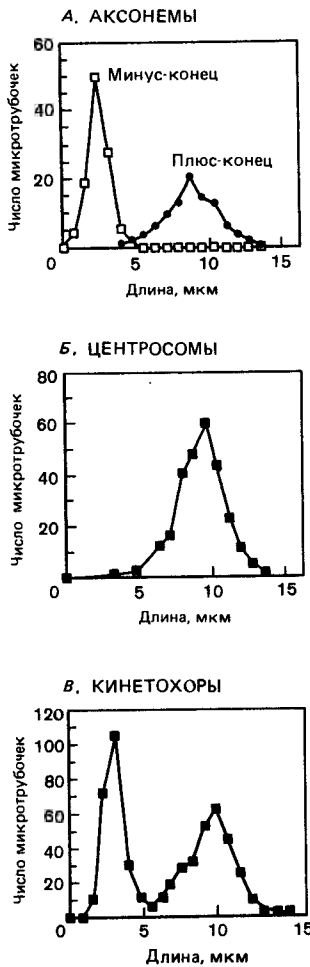


Рис. 11-18. Распределение микротрубочек по длине, когда они присоединены к аксонам (А), к centrosомам (Б) и к кинетохорам (В) (задача 11-24).

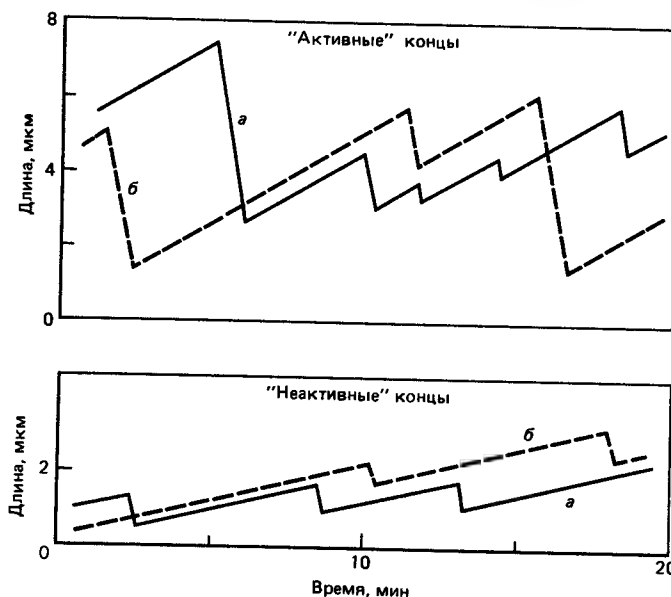
11-25

Из-за сложной кинетики процесса сборки микротрубочек предсказать поведение индивидуальных микротрубочек очень трудно. Некоторые микротрубочки в популяции могут удлиняться, даже если большинство других укорачиваются и исчезают. Одно из простых объяснений такого поведения заключается в том, что удлиняющиеся концы защищаются от распада «колпачком» (колпачком) из GTP, и чем быстрее сборка, тем длиннее такой колпачок (концевой участок микротрубочки, где GTP еще не успел гидролизироваться). В последнее время прогресс видеотехники позволил осуществить наблюдение за индивидуальными микротрубочками в реальном масштабе времени. На рис. 11-19 показан типичный результат наблюдений за изменением во времени длины двух микротрубочек. При измерении скоростей удлинения и укорочения выяснилось, что один конец каждой микротрубочки («активный» конец) нарастает в три раза быстрее, а укорачивается вдвое медленнее, чем другой конец («неактивный»). Считается, что активный конец соответствует плюс-концу, но из данного эксперимента это не следует.

- Существует ли взаимосвязь между происходящими на двух концах микротрубочки изменениями ее длины? Что вы можете сказать по этому поводу?
- Что предсказывает гипотеза GTP-колпачка о частоте переключения между фазами сборки и деполимеризации на быстром удлиняющемся конце относительно медленно растущего конца?

Рис.
про
мик
Кри
мик

Рис. 11-19. Изменения длины, происходящие на концах отдельных микротрубочек (задача 11-25). Кривые, относящиеся к отдельным микротрубочкам, обозначены а и б.



Подтверждают ли эту гипотезу результаты данного эксперимента?

- В. Этот эксперимент проведен с чистым тубулином. Как, по вашему мнению, изменится результат, если в раствор добавить центросомы? А если добавить белки, ассоциированные с микротрубочками?

Промежуточные филаменты (МБК 11.5)

11-26 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Белки, входящие в состав промежуточных филаментов, разделяются на несколько групп; самая крупная из них — это _____, которые у человека присутствуют в 19 различных формах в эпителиальных тканях и еще в 8 — в волосах и ногтях.
- Б. Белок промежуточных филаментов типа II _____ широко представлен в клетках мезенхимного происхождения, таких как фибробласты, клетки эндотелия и лейкоциты.
- В. Другой белок, входящий в состав промежуточных филаментов типа II — _____ — присутствует как в гладких, так и в поперечнополосатых мышцах.
- Г. Глиальные филаменты в астроцитах и некоторых шванновских клетках построены из _____.
- Д. Входящие в состав промежуточных филаментов белки типа III организованы в _____, которые являются главными элементами цитоскелета в аксонах и дендритах нервных клеток.
- Е. _____ образуют сложно устроенные двумерные слои филаментов, которые на определенных стадиях митоза быстро распадаются и вновь собираются.

11-27 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Промежуточные филаменты названы так из-за их толщины — промежуточной между толщиной микрофиламентов и толщиной микротрубочек.

- Б. Промежуточные филаменты можно растворить лишь в концентрированных растворах солей и в присутствии неионных детергентов.
- В. В большинстве клеток встречаются промежуточные филаменты по крайней мере двух типов.
- Г. Судя по огромному разнообразию промежуточных филаментов, их белки кодируются большим числом эволюционно родственных генов.
- Д. Основной структурной единицей в белках промежуточных филаментов является состоящая из двух цепей скрученная спираль, сходная с теми, из которых состоят тропомиозин и миозин.
- Е. Значение фосфорилирования для разборки промежуточных филаментов можно наиболее убедительно продемонстрировать на примере ядерных ламинов, которые фосфорилируются и подвергаются разборке всякий раз, когда клетка вступает в митоз.
- Ж. Цитоплазматические промежуточные филаменты, как считается, важны для сохранения клетками жизнеспособности.
- 3. Белковый состав промежуточных филаментов, являясь своего рода «отпечатками пальцев», может быть очень полезен для выяснения происхождения опухолей.

11-28 Вы только что определили аминокислотную последовательность ядерного ламина С на основе последовательности нуклеотидов клонированного кДНК. Ультраструктурные данные и гомологии нуклеотидных последовательностей позволяют думать, что ядерные ламины относятся к семейству промежуточных филаментов. Если ядерный ламиин С входит в это семейство, в его первичной структуре должны встречаться участки с характеристиками для структуры «витой канат» гептадными повторами AbcDefg, где А и D — гидрофобные аминокислоты, а b, c, f и g могут быть почти любой аминокислотой. Ваша последовательность приведена на рис. 11-20, и потенциальные области со структурой типа витого каната выделены жирным шрифтом. Рассмотрите сегмент, обозначенный как «виток 1А». Может ли он быть гептадным повтором? (Мнемоника «FAMILY V» поможет вам находить гидрофобные аминокислоты.)

Виток 1А

METPSQRRATRSGAQASSTPLSPTRITRLQEKEDLQELNDRLAVYIDRVRSLETENA

Виток 1Б

GLRLRITESEEVVSREVSGIKAAEAEELGDARKTLDVAKERARLQLELSKVREEFK

ELKARNTKKEGDLIAAQARLKDLLEALLNSKEAALSTALSEKRTLEGELHDLRGQVAK

LEAALGEAKKQLQDEMLRRVDAENRLQTMKEELDFQKNYSEELRETKRRRHETRLVE

Виток 2

IDNGKQREFESRLADALQQLRAQHEDQVEQYKKELEKTYSAKLDNARQSAERNNSLV

GAANEELQOSRIRIDSLSAQLSQKQLAAKEAKLRDLEDLSLARERDTSRRLAEKE

REMAEMRARMQQQLDEYQQLLDIKLALDMQIHAYRKLEGEERLRLSPSPTSQRSR

GRASSHSSQTQGGGSVTKKRKLESTESRSSPSQHARTSGRVAVEEVDEEGKFVRLRN

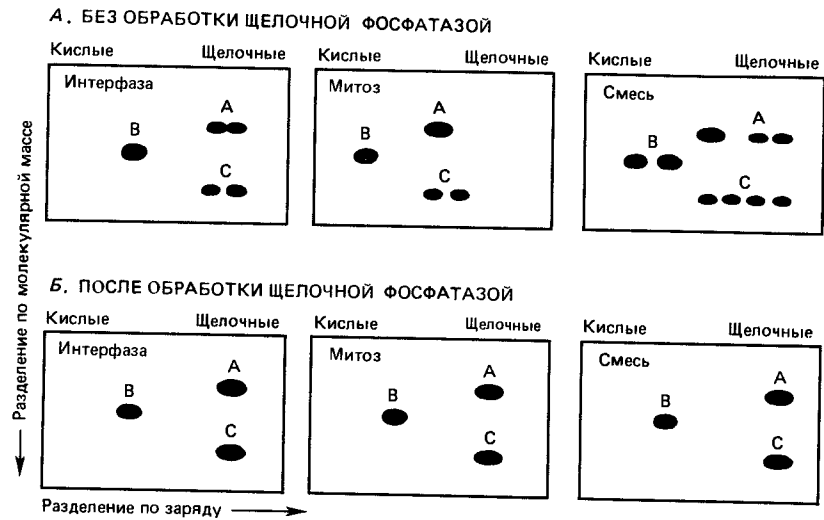
KSNEDQSMGNWQIKRQNGDDPLLTYRFPKFTLKAGQVVTIWAAGAGATHSPPTDLV

WKAQNTWGCNSLRITALINSTGEEVAMRKLVRSVTVVEDDEDEDGDDLLHHNHVSGS

RR

Рис. 11-20. Аминокислотная последовательность ядерного ламина С (задача 11-28).

Рис. 11-21. Двумерное разделение ядерных ламинов из интерфазных и митотических клеток (задача 11-29). А. Без обработки щелочной фосфатазой. Б. После обработки щелочной фосфатазой. Буквы обозначают положения ламинов А, В и С. Смесь (третья пара гелей) готовили из очищенных ламинов, выделенных из интерфазных и митотических клеток. Кислые белки заряжены более отрицательно; основные – более положительно.



11-29 Ядерная оболочка укреплена волокнистой сеткой из ламинов (ядерной ламиной), которая поддерживает мембрану со стороны ядра. Когда клетка входит в митоз, ядерная оболочка разрушается, а ядерная ламина подвергается дезинтеграции. Сборка и дезинтеграция (разборка) ядерной ламины регулируются, по-видимому, путем обратимого фосфорилирования ламинов А, В и С, судя по тому, что ламины из митотических клеток несут гораздо больше фосфата, чем ламины из интерфазных клеток.

Для выяснения роли фосфорилирования вы метите клетки ^{35}S -метионином и затем выделяете в очищенном виде ламины А, В и С из митотических и из интерфазных клеток. После этого с помощью двумерного электрофореза вы анализируете очищенные ламины отдельно для каждой группы клеток и смесь ламинов из митотических и интерфазных клеток (рис. 11-21, А). Кроме того, вы обрабатываете такие же образцы щелочной фосфатазой (она отщепляет от белков фосфат), после чего подвергаете их анализу тем же способом (рис. 11-21, Б).

- Почему обработка щелочной фосфатазой уменьшает число пятен ламинов до трех независимо от их исходного числа (до обработки фосфатазой)?
- Сколько фосфатных групп соединены с ламинами А, В и С в интерфазе и митозе? Что вы можете об этом сказать?
- Почему в эксперименте, где изучалась степень фосфорилирования, для мечения ламинов был использован не ^{32}P -фосфат, а ^{35}S -метионин? Как выглядели бы радиоавтографы в случае использования ^{32}P -фосфата?
- Как вы думаете, служат ли эти результаты доказательством того, что разборка ламинов в ходе митоза вызвана их обратимым фосфорилированием?

Организация цитоскелета (МБК 11.6)

11-30 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- Для эффективного передвижения животных клеток по субстрату вся их плазматическая мембрана должна пребывать в относительно спокойном состоянии, за исключением _____, где

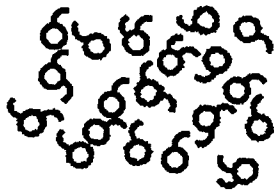


Рис. 11-22. Декорированные тубулином микротрубочки на поперечном срезе аксона нерва (задача 11-32). Декорирующий тубулин имеет вид «крючков».

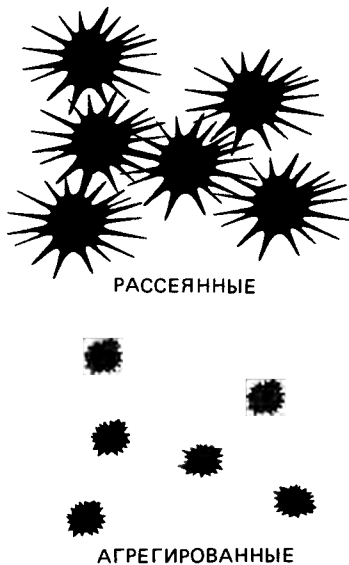


Рис. 11-23. Рассеянные и агрегированные гранулы пигмента в меланофорах (задача 11-33).

периодически выдвигаются вперед ламеллоподии и микрошпили.

- Б. Когда две передвигающиеся клетки сталкиваются, соприкосновение обычно вызывает их немедленную остановку (паралич). Это явление называют _____.
- В. Специализированные эпителиальные клетки, находящиеся в улитке и в преддверии внутреннего уха, называют _____.

- 11-31 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие – нет. Если утверждение неверно, объясните почему.
- А. Большинство ферментов цитозоля (если не все) физически связаны с цитоскелетом.
 - Б. Поляризованное движение клеток осуществляется у одних клеток с помощью микротрубочек, а у других – с помощью микрофиламентов.
 - В. Рост нейритов подавляется колхицином, но не цитохалазином.
 - Г. Слизевикам миозин необходим для клеточного деления, но не для движения.
 - Д. Рециклизация мембраны происходит почти исключительно в переднем крае движущейся клетки.

- 11-32 Помимо двустороннего проведения нервных импульсов, аксоны транспортируют в обоих направлениях везикулы – из тела нейрона и в него. Двигутся эти везикулы, по-видимому, вдоль микротрубочек аксона. Чем определяется направление движения везикул: ориентацией микротрубочек («выходящие» из тела клетки везикулы перемещаются по микротрубочкам, находящимся в одной ориентации, а «входящие» – по противоположно ориентированным) или характером ответственных за движение белков (все микротрубочки ориентированы одинаково, а перемещение везикул в противоположных направлениях обеспечивается разными «белковыми моторами»)?

Чтобы узнать, какая из этих возможностей реализуется в действительности, вы приготовили поперечный срез аксона нерва и декорировали микротрубочки «крючками» из тубулина. Декорированные микротрубочки показаны на рис. 11-22. Что можно сказать об их ориентации?

- 11-33 Внутриклеточное движение частиц в особых клетках – меланофорах – африканской рыбы *Tilapia nassambica* регулируется, по-видимому, за счет фосфорилирования. Благодаря присутствию на поверхности ее тела таких клеток эта рыба способна менять свой цвет. В меланофорах содержатся мелкие гранулы черного пигмента, которые могут рассеиваться по всему объему клетки (и тогда она становится темнее) или агрегировать, образуя небольшое пятно в середине клетки (отчего она кажется более светлой) (рис. 11-23). Переходы из одного состояния в другое происходят за считанные минуты в ответ на гормональную стимуляцию. Пигментные гранулы движутся вдоль микротрубочек.

Меланофоры можно сделать проницаемыми для небольших молекул, осторожно обработав их детергентом в низкой концентрации. Если добавить к таким клеткам АТФ, то происходит агрегация пигмента, а если добавить еще и cAMP, то пигментные гранулы, напротив, рассеиваются. Можно заставить меланофоры циклически собирать и вновь рассеивать пигмент, отмывая и вновь добавляя cAMP. Влияние cAMP на

различные процессы в клетке обычно осуществляется за счет активации сАМР-зависимых протеинкиназ. Может ли подобная система регулировать движение пигмента в меланофорах?

Для проверки этой гипотезы исследовали действие на агрегацию и дисперсию пигмента группы веществ, влияющих на фосфорилирование и дефосфорилирование; ниже приводятся результаты проведенных экспериментов.

1. Добавленный ингибитор протеинкиназ подавлял сАМР-индуцированную дисперсию пигмента.
 2. Ванадат натрия — мощный ингибитор протеинфосфатаз — не влиял на рассеяние пигмента, но подавлял его агрегацию.
 3. АТР- γ -S вызывал медленное рассеяние пигмента в отсутствие АТР и сАМР (структура АТР- γ -S приведена на рис. 11-7). АТР- γ -S может служить субстратом для многих протеинкиназ, но, как правило, не может быть источником энергии в системах, для функционирования которых используется свободная энергия гидролиза АТР (см. задачу 11-8).
 4. Пигмент, диспергированный под действием АТР- γ -S, крайне медленно reagрегировал при замене буфера на свежий, содержащий только АТР, — в противоположность тому, что наблюдается при рассеянии, вызванном АТР и сАМР.
 5. При инкубации с АТР- γ - 32 P в присутствии сАМР метка включалась в белок с молекулярным весом 57 000 Да; если сАМР удаляли, метка из белка исчезала.
- А. Предложите молекулярную модель регуляции рассеяния и агрегации пигментных гранул.
- Б. Нужна ли для рассеяния пигмента и/или для его агрегации свободная энергия гидролиза АТР?

- 11-34 Выяснить, как растут нервные клетки, казалось бы, несложно. Вводя в тело нервной клетки радиоактивные аминокислоты и определяя их включение в белки, исследователи показали, что белки выходят из тела нейрона и движутся по аксонам. На рис. 11-24 приведен результат эксперимента, в котором морской свинке делали инъекцию 3 H-лейцина в область иннервирующего язык нерва. Спустя девять дней животное забивали. Нервное волокно извлекали и разрезали на кусочки длиной 2 мм, которые анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия. Белки можно было

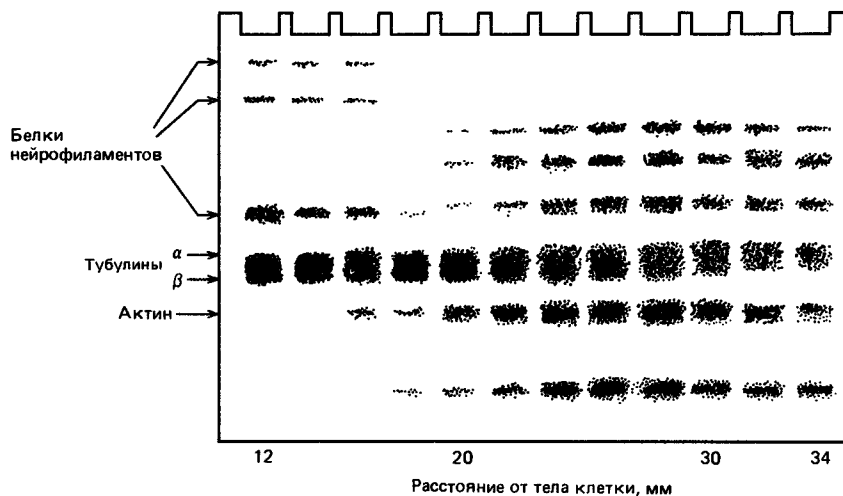


рис. 11-24. Результаты анализа меченых белков, движущихся вдоль аксона, с помощью гель-электрофореза в присутствии ДСН (задача 11-34).

разделить грубо на три группы. Гетерогенная группа гликопротеинов, находящихся в везикулах, мигрирует столь быстро, что успевает выйти за пределы показанного на рис. 11-24 участка аксона. Актин и ряд растворимых ферментов движется быстрее (примерно 3 мкм в день), чем белки нейрофиламентов (примерно 1 мкм в день). Тубулин, по-видимому, попадает в оба последних класса.

Эти данные послужили основой для предположения, что сборка нейрофиламентов и микротрубочек происходит в теле клетки, а затем они движутся вдоль аксона в виде целостной структуры («единым фронтом»), которая остается интактной, пока не достигнет конца аксона, где разрушается или рециклируется.

Однако ваши собственные наблюдения за ростом нервов в культуре (концы отростков движутся со скоростью около 40 мкм/ч) заставляют вас скептически относиться к этому традиционному взгляду на рост аксонов. По вашему мнению, конец растущего аксона ведет себя так, как будто он может выбирать, куда ему расти, а не так, будто его толкают сзади. Чтобы узнать, где же осуществляется сборка микротрубочек, вы добавляете с помощью микропипетки ингибитор микротрубочек — колхицин — поочередно к концу аксона и к его основанию. Когда колхицин действует на конец аксона, рост этого аксона прекращается; в то же время другие необработанные аксоны того же нейрона продолжают расти. Напротив, под действием колхицина на тело клетки подавления роста нервных окончаний не наблюдается. Поскольку плюс-концы микротрубочек располагаются в нервном окончании, вы делаете вывод, что данные экспериментов с использованием метки в какой-то степени вводят в заблуждение — на самом деле рост аксонов происходит на конце. Вашу работу опубликовали, но она вызвала много возражений.

- А. Как соотносятся скорость роста нервных окончаний, измеренная под микроскопом, со скоростью движения белков по аксону, определенной с помощью радиоактивной метки?
- Б. Если вы сторонник той гипотезы, которая предполагает, что сборка микротрубочек происходит в теле клетки, как вы объясните действие колхицина?
- В. Если вы придерживаетесь того мнения, что сборка происходит на конце аксона, то как вы объясните приведенные на рис. 11-24 результаты, полученные с помощью метки?
- Г. Если бы вы могли вводить в нервные клетки тубулин, конъюгированный с биотином, то какую картину движения меченого сегмента микротрубочек по аксону следует ожидать в соответствии с первой и второй гипотезами о росте аксонов?

**Три системы химической сигнализации:
эндокринная, паракринная и синаптическая (МБК 12.1)**

12-1 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Специализированные эндокринные клетки секретируют _____, которые распространяются с кровотоком и влияют на клетки-мишени, находящиеся в разных частях тела.
- Б. Химические медиаторы, которые действуют лишь на клетки, находящиеся в непосредственной близости от места выброса, участвуют в процессе, называемом _____.
- В. Передачу сигналов между клетками нервной системы осуществляют _____, которые секретируются в специализированных контактах, называемых химическими синапсами.
- Г. Эндокринная система у позвоночных физически и функционально связана с нервной системой; роль связующего звена выполняет специальный отдел мозга, который называется _____.
- Д. _____ – функционально важное семейство локальных химических медиаторов, представляющих собой производные жирных кислот, состоящих из 20 углеродных атомов.

12-2 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие – нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Эндокринные сигналы вызывают относительно замедленный ответ, ибо их распространение определяется диффузией и скоростью кровотока.
- Б. Специфичность эндокринного сигнала зависит от природы воспринимающих клеток, их рецепторы прочно связывают гормон за счет большого числа слабых химических взаимодействий.
- В. Концентрация нейромедиатора в нервно-мышечном синапсе может в 5000 раз превышать эффективную концентрацию гормона в крови.
- Г. Гормоны быстро удаляются из крови за счет действия гидролитических ферментов.
- Д. Специфичность сигнальных молекул такова, что они действуют всегда по одному и тому же типу сигнализации: эндокринному, паракринному или синаптическому.
- Е. Если одна и та же сигнальная молекула по-разному действует на отдельные ткани-мишени, то обычно различаются и рецепторы, опосредующие эти эффекты.
- Ж. Одна из причин, по которой физиологические реакции, вызываемые пептидными гормонами (например, инсулином), развиваются довольно медленно, состоит в том, что пептид должен быть вначале синтезирован вырабатывающей его эндокринной клеткой.

- 3. Водорастворимые гормоны взаимодействуют с рецепторами, расположенными на поверхности плазматической мембраны, а жирорастворимые гормоны, растворимые в липидах, связываются, как правило, с внутриклеточными рецепторами.
- И. Тучные клетки секретируют гистамин, стимулирующий воспалительную реакцию, а также выделяют два тетрапептида, которые служат аттрактантами для эозинофилов. Эти последние синтезируют антигистаминные вещества и тем самым «тушат» воспалительный процесс.

12-3 Чтобы получить антитела против ацетилхолинового рецептора, выделенного из электрического органа электрического угря, вводите препарат очищенного рецептора мышам. По мере развития иммунного ответа вы замечаете интересную корреляцию: мыши с высоким уровнем антител против рецептора выглядят слабыми и вялыми, тогда как мыши, у которых уровень антител низкий, сохраняют обычную активность. Вы подозреваете, что антитела к ацетилхолиновому рецептору угря способны взаимодействовать с мышечными ацетилхолиновыми рецепторами, вызывая деструкцию многих из них. Поскольку уменьшение количества ацетилхолиновых рецепторов у человека служит причиной аутоиммунного заболевания — тяжелой миастении (*myasthenia gravis*), вы решаете проверить, не приведет ли инъекция лекарственного препарата неостигмина к временному восстановлению сил, как это происходит у больных миастенией. Действительно, после введения неостигмина мышцы моментально «оживают» и становятся весьма активными. Предложите объяснение того, каким образом неостигмин может временно восстанавливать нормальную работу нервно-мышечного синапса с пониженным количеством рецепторов ацетилхолина.

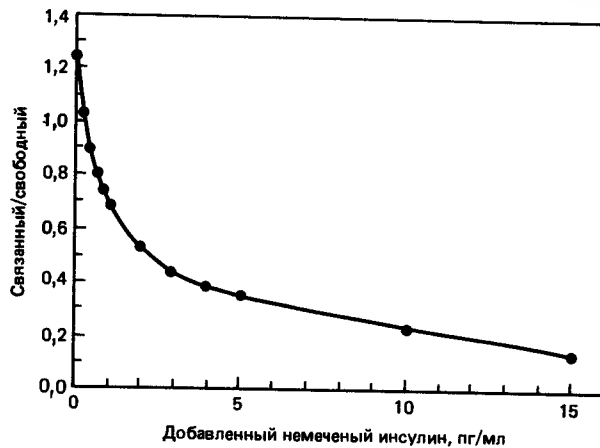
12-4 Сукцинилхолин (аналог ацетилхолина) используется в хирургии в качестве миорелаксанта. Применение его требует осторожности, поскольку некоторые пациенты после такого обездвиживания (паралича) восстанавливаются слишком медленно, что создает угрозу для их жизни. У этих индивидов обнаружен недостаток фермента псевдохолинэстеразы, в норме присутствующего в крови.

Если сукцинилхолин — это аналог ацетилхолина, то как вы думаете, почему он вызывает расслабление мышц, а не их сокращение, как ацетилхолин?

12-5 Радиоиммуноанализ (РИА), отличаясь чувствительностью, точностью и быстротой, может быть мощным инструментом для количественного определения практически любого вещества, представляющего биологический интерес. Основы метода были разработаны в процессе изучения диабета у взрослых, когда в крови больных были обнаружены антитела с высоким сродством к инсулину и понадобилось разработать приемы, позволяющие отличать свободный инсулин от инсулина, связанного с антителами.

Как можно использовать антитела с высоким сродством к инсулину и методы разделения связанного и свободного инсулина для измерения его низких концентраций? Если небольшое количество антисыворотки к инсулину смешать с таким же небольшим количеством высокорadioактивного инсулина, то часть инсулина

рис. 12-1. Калибровочная кривая для радиоиммуноанализа инсулина (задача 12-5).



связь, а часть останется свободной в соответствии с равновесием:



$$K = k \frac{[\text{Комплекс инсулин-антитело}]}{[\text{Инсулин}] [\text{Антитело}]}$$

При добавлении к этой смеси (где количества радиоактивно меченного инсулина и антител постоянны) возрастающих количеств немеченого инсулина отношение связанного радиоактивного инсулина к свободному будет — в соответствии с уравнением равновесия — уменьшаться (рис. 12-1). Если концентрации немеченого гормона известны, то полученная кривая может служить в качестве калибровочной при исследовании неизвестных образцов.

У вас есть три пробы, где нужно определить концентрацию инсулина. После смешивания их с теми же количествами радиоактивного инсулина и антиинсулиновых антител, которые использовались при получении калибровочной кривой, приведенной на рис. 12-1, были выявлены следующие соотношения (связанный инсулин/свободный инсулин):

проба 1	0,67
проба 2	0,31
проба 3	0,46.

- А. Какова концентрация инсулина в каждой из этих проб?
- Б. На каком участке калибровочной кривой точность определения наибольшая и почему?
- В. Если имеющиеся у вас антитела были выработаны против свиного инсулина (с человеческим он сходен, но не идентичен ему), будут ли они пригодны для измерения этим методом концентрации инсулина человека?

12-6 Оптимум чувствительности метода радиоиммуноанализа наблюдается при равенстве концентраций определяемого вещества и радиоактивного стандарта. Таким образом, абсолютная чувствительность метода лимитируется удельной радиоактивностью меченого лиганда. Чем выше удельная радиоактивность лиганда, тем меньше его можно добавлять в каждую пробу и, следовательно, тем меньшее количество вещества в анализируемом образце можно определить.

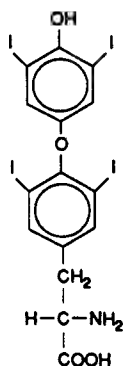


Рис. 12-2. Структура тироксина (задача 12-7).

Вы хотите измерить концентрацию инсулина (молекулярная масса 11 466) в образце, пользуясь инсулином, меченным радиоактивным йодом (период полураспада 7 сут). Предположим, что мечение производится из расчета один атом радиоактивного йода на молекулу инсулина, что йод не влияет на связывание инсулина антителами, что эффективность счета (вероятность зарегистрировать каждый радиоактивный распад как «импульс») составляет 50%, а минимальное общее количество радиоактивности (связанная + свободная) для данного метода должно быть не менее 1 000 импульсов в минуту (имп/мин).

- А. Исходя из этого рассчитайте, сколько радиоактивного инсулина (в пикограммах) потребуется для одного определения.
- Б. Сколько пикограммов немеченого инсулина можно будет обнаружить при оптимальной чувствительности?

12-7 Тиреоидный гормон тироксин состоит из двух соединенных друг с другом йодированных остатков тирозина (рис. 12-2). В щитовидной железе он накапливается в специальных структурах, называемых фолликулами, причем в виде составной части гораздо более крупного белка тиреоглобулина. Фолликул представляет собой внеклеточную полость (просвет фолликула), окруженную клетками эпителия. При действии на щитовидную железу тиреотропного гормона (ТТГ) тироксин отщепляется с помощью протеаз от тиреоглобулина и высвобождается в кровоток.

Проследить в деталях цепь событий, конечное звено которой – выброс тироксина в кровь, оказалось совсем непросто. Когда щитовидная железа стимулируется ТТГ, в цитоплазме фолликулярных клеток появляются капли коллоида. Сходство веществ этих капель с веществом в просвете фолликула породило интересные споры о том, что представляют собой эти капли: вещество, поставляемое фолликулярной клеткой в просвет (для пополнения запаса), или, наоборот, вещество из просвета фолликула, поглощенное клеткой (для образования тироксина)? Вопрос был разрешен с помощью серии экспериментальных наблюдений.

1. Если пометить коллоид в просвете фолликула радиоактивным йодом, ^{131}I , а затем стимулировать фолликулы посредством ТТГ в условиях, предотвращающих дальнейшее включение метки, радиоактивность появляется во внутриклеточных каплях.
2. Эти капли образуются спустя примерно 4 мин после добавления ТТГ и появляются сначала в апикальных выростах клеток, граничащих с просветом фолликула, затем в апикальной части клетки и наконец в ее базальной части.
3. Находящийся в полости фолликула тиреоглобулин несет остаток маннозо-6-фосфата, которым обычно маркируются белки для их доставки в лизосомы.

Какой механизм образования тироксина и его выброса из фолликулярных клеток можно предложить на основе этих наблюдений?

Сигнализация с участием внутриклеточных рецепторов: механизмы действия стероидных гормонов (МБК 12.2)

12-8 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Небольшое число _____ – все они синтезируются из холесте

рола – регулирует процессы развития и физиологические реакции у широкого круга организмов – от грибов до человека.

Б. При связывании стероидного гормона рецептор претерпевает конформационное изменение (процесс, называемый _____), в результате чего увеличивается сродство рецептора к ДНК и он приобретает способность связываться в ядре со специфическими генами и регулировать их транскрипцию.

В. Гормон линьки у *Drosophila* называется _____.

Г. Синдром, при котором у млекопитающих с мужским генотипом вследствие дефекта рецепторов тестостерона развиваются женские вторичные половые признаки, носит название _____.

12-9 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие – нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

— А. Все известные к настоящему времени стероидные гормоны являются ДНК-связывающими белками.

— Б. Физиологическая реакция на стероидные гормоны обычно проходит в две стадии, из которых лишь первая (первичный ответ) вызывается непосредственно связыванием гормон-рецепторного комплекса с ДНК.

— В. За связывание лиганда и за узнавание ДНК и активацию гена у рецепторов стероидных гормонов ответственны разные домены.

— Г. Рецептор для эстрадиола, кортизола и прогестерона кодируется одним геном.

— Д. Все клетки, чувствительные к определенному стероидному гормону, содержат один и тот же рецептор, однако ответы этих клеток на гормон могут сильно различаться, потому что для включения тех или иных генов помимо активированного рецептора стероидов могут требоваться и другие белки.

12-10 Вы изучаете экспрессию генов, соединенных с регулируемым глюкокортикоидами сегментом вируса саркомы мышей Молони. Вы создали набор молекул ДНК, содержащих вирусный сегмент в обеих ориентациях выше и ниже репортерного гена (хлорамфениколацетилтрансферазы, *CAT*). Затем вы провели трансфекцию этими ДНК двух клеточных линий, происходящих из разных тканей, и измерили активность *CAT* в присутствии и в отсутствие глюкокортикоида (дексаметазона). Изменение ориентации и местоположения вирусного сегмента относительно слабо влияло на экспрессию репортерного гена – результат, который следует ожидать, если вирусный сегмент содержит энхансер транскрипции. Результаты трансфекции одним лишь геном *CAT* и геном *CAT*, соединенным с вирусным сегментом в одной (фиксированной) ориентации, показаны на рис. 12-3. Вы озадачены результатами для клеточной линии 1: вирусный сегмент усиливает экспрессию *CAT* в 20 раз в отсутствие дексаметазона!

Рис. 12-3. Результат трансфекции двух различных конструкций ДНК в две разные клеточные линии (задача 12-10). Знак (+) означает присутствие, а знак (–) отсутствие гормона (дексаметазона). Числа означают уровень экспрессии продукта гена *CAT* (по отношению к его экспрессии после трансфекции «в чистом виде» – без вирусного сегмента).

ГИБРИДНАЯ ДНК		Клеточная линия 1		Клеточная линия 2		Дексаметазон
Промотор	Ген <i>CAT</i>	–	+	–	+	
—	—	1	1	1	1	Уровень экспрессии <i>CAT</i>
—	→	20	100	1	80	
Энхансер						

- А. Содержат ли клетки обеих линий рецепторы глюкокортикоидов? Что можно об этом сказать?
- Б. Чем клеточная линия 1 отличается от клеточной линии 2? Предложите возможное объяснение этого различия.
- В. Предскажите, исходя из вашего объяснения, результат эксперимента, в котором перед геном *CAT* помещаются разнообразные более короткие участки вирусного сегмента, а затем аналогичным образом в двух линиях клеток проверяется активность *CAT*.

12-11 Глюкокортикоиды индуцируют транскрипцию генов вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV – mouse mammary tumor virus). Используя гибридные молекулы ДНК, в которых длинные концевые повторы (LTR – long terminal repeats) вируса были соединены с легко тестируемым геном, вы показали, что LTR содержат регуляторные элементы, реагирующие на глюкокортикоиды. Чтобы картировать эти чувствительные к глюкокортикоидам элементы в составе LTR, вы произвели серию делений, в результате которых были удалены различные по длине фрагменты LTR (рис. 12-4), и затем определили связывание полученных сегментов ДНК с глюкокортикоидными рецепторами. Для измерения связывания вы разрезали каждую мутантную ДНК на фрагменты, провели очистку фрагментов, содержащих последовательности LTR, и поместили их концы радиоактивным фосфором ^{32}P . Затем вы проинкубировали смесь меченых фрагментов с очищенным глюкокортикоидным рецептором. Инкубационную смесь вы пропустили через нитроцеллюлозный фильтр, на котором белок (а вместе с ним и связанная ДНК) адсорбируется, а свободная ДНК – нет. Связавшиеся с рецептором фрагменты ДНК вы выявили с помощью электрофореза в агарозном геле. Электрофоретическая картина исходной смеси сегментов и сегментов, связанных с рецептором, показана на рис. 12-4.

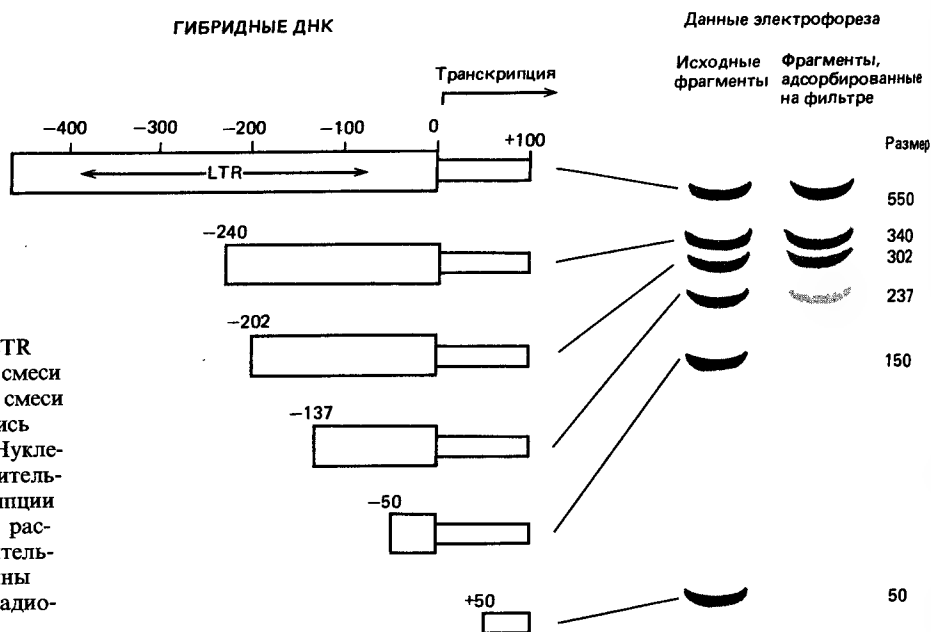


Рис. 12-4. Схема делений в LTR и данные электрофореза для смеси исходных фрагментов ДНК и смеси фрагментов, которые связались с фильтрами (задача 12-11). Нуклеотиды пронумерованы относительно начальной точки транскрипции (+1); отрицательные номера расположены перед ней, положительные – после. В качестве картины электрофореза представлен радиоавтограф агарозного геля.

Рис. 12-5. Последовательности ДНК, которые связываются с рецептором глюкокортикоидов (задача 12-11).

```

1.   CCAAGGAGGGGACAGTGGCTGGACТААТАG
2.   GGACTAATAGAACATTATTCTCCAAAAAСТ
3.   TCGTTTTTAAGAACAGTTTGTAACCAAAAAС
4.   AGGATGTGAGACAAGTGGTTTCCTGACTTG
5.   AGGAAAATAGAACACTCAGAGCTCAGATCA
6.   CAGAGCTCAGATCAGAACCTTTTGATACCA
7.   CATGATTTCAGCACAAAAAGAGCGTGTGCCA
8.   CTGTTATTAGGACATCGTCTTTTCCAGGAC
9.   CCTAGTGTAGATCAGTCAGATCAGATТААА
10.  GATCAGTCAGATCAGATTAAAAGCAAAAAG
11.  TTCCAAATAGATCCTTTTGTCTTTТААСТ
  
```

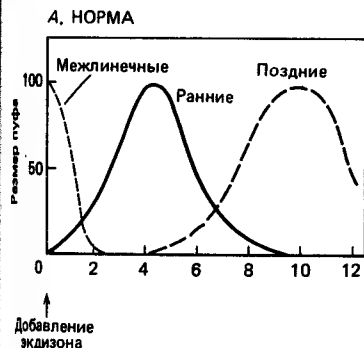


Рис. 12-6. Динамика образования пухов в хромосомах слюнных желез (задача 12-12). А. В норме. Б. В присутствии циклогексимида. В. После удаления экдизона.

- А. В каком месте LTR расположены чувствительные к глюкокортикоидам элементы?
- Б. На рисунке 12-5 приведены одиннадцать последовательностей MMTV (некоторые из них входят в состав LTR), связывающихся с рецептором глюкокортикоидов. Можете ли вы найти в них обобщенную последовательность (консенсус-последовательность), с которой связывается рецептор?

12-12

Личинки дрозофил линяют в ответ на повышение концентрации стероидного гормона экдизона. Замечательной экспериментальной системой для изучения гормон-индуцируемой активности генов служат политенные хромосомы слюнных желез дрозофилы, потому что их активные гены увеличиваются в размерах, образуя пухи, которые видны в световой микроскоп, причем величина пуха пропорциональна скорости его транскрипции. Некоторые пухи, называемые межлинейными, активны и без добавки экдизона. Если же к выделенным слюнным железам добавить экдизон, то эти межлинейные пухи исчезают, зато возникают две группы новых пухов. Первая группа (ранние пухи) появляется уже спустя несколько минут после добавления экдизона, тогда как вторая (поздние пухи) — лишь по прошествии 4–10 ч. Следует отметить, что концентрация экдизона на протяжении всего этого периода времени остается неизменной. Динамика появления и исчезновения пухов после добавки экдизона схематично изображена на рис. 12-6, А.

Два решающих эксперимента помогают прояснить взаимоотношения между пухами различных классов. В первом опыте одновременно с экдизоном добавляют циклогексимид, блокирующий синтез белка. Как показано на рис. 12-6, Б, в этих условиях ранние пухи не исчезают, а поздние не появляются. Во втором эксперименте проводится инкубация с экдизоном в течение 2 ч, после чего препарат хромосом отмывают от него. Из рис. 12-6, В видно, что такая обработка вызывает немедленную регрессию ранних пухов и *преждевременную индукцию* поздних пухов.

- А. Как вы думаете, почему в присутствии циклогексимида ранние пухи не регрессируют, а поздние не индуцируются? Почему ингибитор не влияет на межлинейные пухи?
- Б. Почему, на ваш взгляд, ранние пухи начинают исчезать, как только удален экдизон? Почему в этих же условиях поздние пухи появляются раньше времени?
- В. Предложите модель экдизон-зависимой регуляции образования пухов.

Механизмы передачи сигналов белками-рецепторами клеточной поверхности (МБК 12.3)

12-13 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. _____ рецепторы – это белки клеточной поверхности, помощью которых осуществляется быстрая синаптическая передача сигнала между электрически возбудимыми клетками.
- Б. _____ рецепторы при активации соответствующим лигандом начинают работать как ферменты.
- В. Рецепторы, _____, опосредованно активируют или ингибируют отдельный фермент или ионный канал в цитоплазматической мембране.
- Г. Многие внеклеточные сигналы действуют путем изменения внутриклеточных концентраций _____, из которых два наиболее важных – это cAMP и ионы Ca^{2+} .
- Д. Циклический AMP синтезируется из АТР связанным с плазматической мембраной ферментом _____, а разрушается ферментом _____.
- Е. Рецепторы модулируют активность ферментов, участвующих в синтезе и распаде cAMP, опосредованно – через GTP-связывающие регуляторные белки, называемые _____.
- Ж. Катализируемый _____ перенос остатка ADP-рибозы молекулы NAD^+ на G_s -белок вызывает нерегулируемую активацию аденилатциклазы.
- З. α_2 -Адренергические рецепторы функционально связываются аденилатциклазой через _____, содержащий те же β -и субъединицы, что и G_s -белок, но другую α -субъединицу.
- И. Многие клетки содержат специальный компартмент, отличный от эндоплазматического ретикулума и гомологичный саркоплазматическому ретикулуму мышечных клеток; он служит для запасания и высвобождения Ca^{2+} и называется _____.
- К. Некоторые внеклеточные сигнальные молекулы стимулируют включение радиоактивного фосфата в _____, минорный фосфолипид в составе клеточных мембран.
- Л. _____ – это небольшая водорастворимая молекула, которая вызывает освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ.
- М. Ca^{2+} -зависимый фермент, активируемый диацилглицеролом, носит название _____.
- Н. _____, кодируемые вирусными онкогенами, отличаются от своих нормальных гомологов тем, что в них заменены одна или две аминокислоты, в результате чего подавлена их GTPазная активность.
- О. Многие каталитические рецепторы – это трансмембранные белки, однократно пронизывающие мембрану и обладающие _____ активностью.

12-14 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие – нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Рецепторы клеточной поверхности нередко переносят свои лиганды внутрь клетки с помощью опосредованного рецептором эндоцитоза, однако в основе передачи ими сигнала лежит не этот процесс.
- Б. Каталитические рецепторы, которые действуют непосредственно в качестве ферментов, обычно обладают тирозинспецифичной протеинкиназной активностью.

- В. Фермент гликогенфосфорилаза — это протеинкиназа, которая стимулируется циклическим АМР.
- Г. Для синтеза сАМР в ответ на гормональную стимуляцию помимо АТР необходим также GTP.
- Д. Когда G_s -белки связывают GTP, они диссоциируют на α - и $\beta\gamma$ -субъединицы.
- Е. Замена GDP на GTP в комплексах с G-белками катализируется рецептором, активированным лигандом.
- Ж. Аденилатциклаза остается в активированном состоянии до тех пор, пока взаимодействующий с ней G_s -белок не гидролизует GTP до GDP и не отделится в результате диссоциации.
- З. Для активации аденилатциклазы негидролизруемыми аналогами GTP необходимо присутствие соответствующего гормона, а для активации холерным токсином этого не требуется.
- И. Изменение внутриклеточного уровня Ca^{2+} может быть вызвано активацией фосфолипазы C, которая делает плазматическую мембрану на короткое время проницаемой для ионов Ca^{2+} , гидролизуя мембранные фосфолипиды.
- К. Действие инозитолтрифосфата заключается в непосредственной активации протеинкиназы C.
- Л. Самые высокие уровни протеинкиназы C обнаружены в мозгу, где она, по-видимому, модулирует активность ионных каналов путем обратимого фосфорилирования.
- М. Форболовые эфиры непосредственно активируют протеинкиназу C.
- Н. G-белок трансдуцин, который обнаружен в глазах у позвоночных, активирует фосфодиэстеразу cGMP, тем самым уменьшая рост уровня cGMP в ответ на освещение.
- О. Онкоген *sis* кодирует функционально активный вариант рецептора РФТ (ростовой фактор из тромбоцитов, или PDGF, platelet-derived growth factor).

12-15 Вы хотите измерить количество β -адренергических рецепторов на мембранах эритроцитов лягушки. Эти рецепторы в норме связывают адреналин и стимулируют активность аденилатциклазы. Однако вы решили использовать не адреналин, а его конкурентный ингибитор альprenолол, который связывается с рецепторами в 500 раз более прочно. Методика эксперимента состоит в том, что вы добавляете к суспензии мембран меченый альprenолол и инкубируете смесь в течение 10 мин при 37°C , затем осаждаete мембраны центрифугированием и измеряете радиоактивность осадка. Вы поставили эксперимент в двух вариантах. В первом было измерено связывание возрастающих количеств ^3H -альprenолола с фиксированным количеством мембран эритроцитов, чтобы определить общее связывание. Во втором варианте вы повторили эксперимент в присутствии значительного избытка немеченого альprenолола, чтобы измерить неспецифическое связывание. Ваши результаты изображены на рис. 12-7.

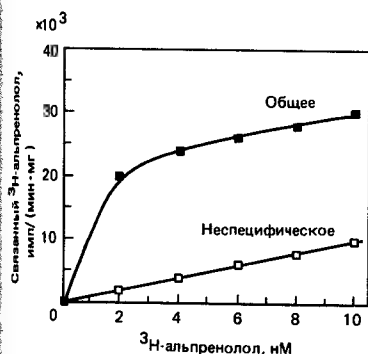


Рис. 12-7. Связывание ^3H -альprenолола с мембранами эритроцитов лягушки (задача 12-15).

- А. Опишите, как пойдет кривая специфического связывания альprenолола с β -адренергическими рецепторами. Достигло ли специфическое связывание уровня насыщения?
- Б. Принимая, что с одной молекулой рецептора связывается одна молекула альprenолола, рассчитайте, сколько β -адренергических рецепторов находится на мембране одного эритроцита лягушки. Удельная радиоактивность меченого альprenолола

составляет 1×10^{13} имп/(мин·ммоль), а один миллиграмм белка мембран соответствует 8×10^8 эритроцитам лягушки.

- 12-16** Зрительное возбуждение начинается с фотоизомеризации *цис*-ретиная (хромофорной группы родопсина) в его полную *транс*-конфигурацию. Это приводит к активации родопсина, который катализирует обмен GDP на GTP в трансдуцине (G-белок). Затем активированная таким образом α -субъединица трансдуцина стимулирует фосфодиэстеразу циклического GMP (сGMP), которая быстро гидролизует свой субстрат и удаляет тем самым кофактор, необходимый для поддержания Na^+ -каналов в открытом состоянии. В результате мембрана гиперполяризуется, и эта гиперполяризация передается на соседние клетки.

Было определено, что активация одной молекулы родопсина приводит к гидролизу 5×10^5 молекул сGMP в секунду. Одна стадия в этом огромном усилении сигнала – работа фосфодиэстеразы сGMP, которая гидролизует 1000 молекул сGMP в секунду. Дополнительное 500-кратное усиление может достигаться либо за счет того, что каждая молекула родопсина активирует 500 молекул трансдуцина, либо если одна активированная молекула трансдуцина способна вызвать активацию 500 молекул фосфодиэстеразы, либо в результате комбинации двух этих путей. В одном из экспериментов, поставленных для разрешения данного вопроса, измеряли количество GppNp (негидролизуемого аналога GTP), которое связывалось с трансдуцином в присутствии различных количеств активированного родопсина. Как показано на рис. 12-8, на один моль родопсина связывалось 5,5 ммоль GppNp при том, что доля активированного (засвеченного) родопсина составляла 0,0011% от его общего количества.

- А. Принимая, что каждая молекула трансдуцина связывает одну молекулу GppNp, рассчитайте, сколько молекул трансдуцина активировала каждая молекула возбужденного родопсина. В пользу какого из механизмов амплификации свидетельствуют эти данные?
- Б. В экспериментах по связыванию выяснилось, что комплекс трансдуцин–GDP имеет высокое сродство к засвеченному родопсину, а трансдуцин–GTP – низкое; в случае фосфодиэстеразы сGMP картина была обратной: высокое сродство к ней имеет трансдуцин–GTP, низкое – трансдуцин–GDP. Согла-

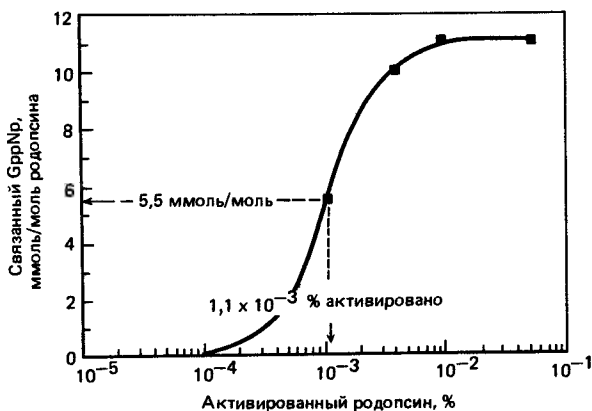


Рис. 12-8. Связывание GppNp мембранами палочек в зависимости от количества активированного родопсина (задача 12-16). Связывание GppNp этими мембранами в темноте принято за фон, и его величина вычтена из полученных значений.

суется ли это с тем механизмом амплификации, который был выбран вами на основании предыдущего эксперимента? Каким образом?

12-17

В сердце, действуя через мускариновые рецепторы, ацетилхолин открывает K^+ -каналы и уменьшает тем самым частоту сердечных сокращений. Обработка клеток сердца коклюшным токсином блокирует эту физиологическую реакцию на ацетилхолин, на основании чего можно предположить, что в сопряжении процессов активации рецепторов и открывания каналов участвует G-белок. Непосредственно действие ацетилхолина можно изучать на вывернутых мембранах с помощью модифицированной техники локальной фиксации (пэтч-кламп). По этому методу микропипеткой вырывают фрагмент клеточной мембраны, так что наружной стороной он контактирует с раствором в пипетке, а цитоплазматической стороной – с омывающим раствором, который можно быстро менять (рис. 12-9). В таком фрагменте мембраны сохраняются рецепторы, K^+ -каналы и G-белки.

Измеряя текущий через мембрану ток можно определить состояние K^+ -каналов. Схема типичного эксперимента такого рода изображена на рис. 12-9. Когда ацетилхолин добавлен (что обозначено знаком «+») в пипетку, прикрепленную к целой клетке, через мембрану течет ток, указывая на то, что K^+ -каналы открыты (рис. 12-9, А). При тех же условиях во фрагменте мембраны, погруженном в буферный солевой раствор, тока нет (рис. 12-9, Б). Если, однако, в омывающий раствор добавить GTP (рис. 12-9, В), ток появляется. Удаление GTP приводит к исчезновению тока (рис. 12-9, Г). Результаты серии подобных экспериментов, в которых определяли действие разных комбинаций компонентов системы, суммированы в табл. 12-1.

- А. Как видно из табл. 12-1 (4-я строчка), добавление в омывающий раствор GppNp (негидролизуемого аналога GTP) вызывало открытие K^+ -каналов даже в отсутствие ацетилхолина. Однако ток нарастал в этом случае очень медленно и достигал максимальной величины лишь спустя одну минуту (сравните с мгновенной величины лишь спустя одну минуту (сравните с мгновенным «включением» тока на рис. 12-9, А и 12-9, В). Каким образом, по вашему мнению, GppNp вызывал открывание каналов в отсутствие ацетилхолина?
- Б. Объясните, почему G-белок, состоящий из двух субъединиц ($G_{\beta\gamma}$), активировал (открывал) канал, а целый (гетеротримерный) G-белок – нет? Является ли в этой системе активным тот же компонент G-белка, который активирует в других клетках аденилатциклазу?

Рис. 12-9. Схема и типичные результаты эксперимента по изучению активации K^+ -каналов ацетилхолином с помощью модифицированного метода «пэтч-кламп» (задача 12-17). Буфер не содержит нуклеотидов или Ca^{2+} . Во всех экспериментах ацетилхолин присутствует в растворе внутри пипетки, что отмечено знаком «+». Ток через мембрану измеряли в пикоамперах (пА). В варианте (В) в буфер добавлен GTP.

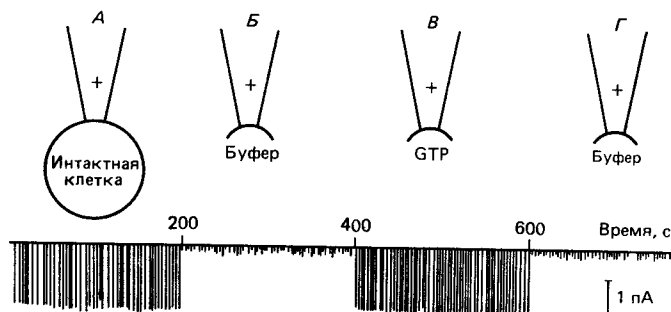


Таблица 12-1. Реакции K^+ -канала на различные экспериментальные воздействия (задача 12-17)

	Ацетил- холин	Добавление в буфер низкомолекулярных соединений	Добавление в буфер очищенных компонентов G-белка	K^+ -канал
1.	+	Без добавок	Без добавок	Закрит
2.	+	GTP	-»-	Открыт
3.	-	GTP	-»-	Закрит
4.	-	GppNp	-»-	Открыт
5.	-	Без добавок	G-белок	Закрит
6.	-	-»-	G_α	»
7.	-	-»-	$G_{\beta\gamma}$	Открыт
8.	-	-»-	G-белок после кипячения	Закрит

В. Дают ли эти эксперименты основание считать, что K^+ -канал скорее всего открывается при участии внутриклеточного посредника?

Г. Нарисуйте на основе этих данных схему активации K^+ -каналов в клетках сердца в ответ на ацетилхолин.

12-18

В линии клеток, полученной из нормальной ткани щитовидной железы крысы, при стимуляции α_1 -адренергических рецепторов увеличиваются одновременно образование инозитолфосфата и высвобождение арахидоновой кислоты. Инозитолфосфат повышает внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , что приводит к выходу тироксина, а арахидоновая кислота служит источником простагландина E_2 , стимулирующего синтез ДНК. Каким же образом освобождение арахидоновой кислоты связано с активацией адренергических рецепторов? Арахидоновая кислота может появляться при расщеплении диацилглицероллипазы диацилглицерола, образующегося вместе с инозитолфосфатом. Другой возможный механизм освобождения арахидоновой кислоты — это независимое влияние рецептора на фосфолипазу A_2 , которая может непосредственно высвобождать арахидоновую кислоту из интактных фосфоглицеридов. Проанализируйте следующие экспериментальные наблюдения.

1. Добавление к культивируемым клеткам норадреналина стимулирует образование как инозитолфосфата, так и арахидоновой кислоты.
2. Если сделать адренергические рецепторы нечувствительными к норадреналину, обработав клетки фтороболовым эфиром (активируя протеинкиназу C, он, видимо, вызывает фосфорилирование рецепторов и тем самым их инактивацию), то добавка норадреналина уже не приводит к увеличению содержания в клетках ни инозитолфосфата, ни арахидоновой кислоты.
3. Если сделать клетки проницаемыми для GTP- γ -S (негидролиземый аналог GTP), то синтез инозитолфосфата и арахидоновой кислоты увеличивается.
4. В клетках, обработанных неомицином (который блокирует действие фосфолипазы C), последующее добавление GTP- γ -S стимулирует выход арахидоновой кислоты, но не вызывает увеличения количества инозитолфосфата.
5. В клетках, обработанных коклюшным токсином, последующее

щее добавление GTP- γ -S стимулирует образование инозитолфосфата, но не арахидоновой кислоты.

- А. В пользу какого из двух предполагаемых механизмов образования арахидоновой кислоты в данных клетках говорят эти наблюдения?
- Б. Предложите молекулярный механизм, объясняющий стимуляцию образования арахидоновой кислоты и согласующийся с экспериментальными данными.

Механизмы действия циклического АМР и ионов кальция (МБК 12.4)

12-19 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Действие сАМР в животных клетках основано на активации им фермента, называемого _____.
- Б. Внутриклеточный рецептор ионов Ca^{2+} , регулирующий большинство Ca^{2+} -зависимых процессов, — это _____.
- В. К наиболее важным мишеням, регулируемым внутриклеточными комплексами Ca^{2+} —кальмодулин, относится семейство ферментов, называемых _____, которые фосфорилируют белки по остаткам серина и треонина.
- Г. Фермент _____ катализирует образование сGMP из GTP.

12-20 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Повышенное содержание сАМР в мышечных клетках способствует синтезу гликогена и подавлению его распада.
- Б. В некоторых клетках увеличение концентрации сАМР приводит к фосфорилированию ДНК-связывающего белка и вследствие этого к активации определенных генов.
- В. Циклический АМР активирует сАМР-зависимую протеинкиназу, связываясь с ее регуляторными субъединицами и высвобождая тем самым каталитические субъединицы в виде активного димера.
- Г. Эффекты фосфорилирования ключевых ферментов А-киназой обращаются под действием фосфорилаз, которые отщепляют от белков присоединенные фосфатные группы.
- Д. Кальмодулин является интегральной частью фермента киназы фосфорилазы.
- Е. В сенсорных органах, таких, как глаз и нос, циклические нуклеотиды регулируют ионные каналы за счет прямого связывания, а не путем влияния на обратимое фосфорилирование белков-мишеней.
- Ж. В клетках имеются эффективные механизмы разрушения сАМР и изоляции (секвестрирования) ионов Ca^{2+} , нужные не только для завершения реакции на эти эффекторы, но также и для того, чтобы их концентрация могла резко увеличиться в ответ на сигнал.
- З. Кальмодулин-зависимая протеинкиназа в клетках мозга — это регулируемый ионами Ca^{2+} переключатель, который может участвовать в формировании памяти: единичный всплеск концентрации Ca^{2+} может привести к тому, что протеинкиназа перейдет в устойчиво активированное состояние, поскольку одна из фосфорилируемых ею мишеней — это она сама.

12-21 Действует ли сАМР исключительно через А-киназу или существуют сАМР-связывающие белки, выполняющие другие важные

функции, например в качестве ДНК-связывающих белков, у бактерий? Вы работаете с линией клеток хомячка, на которой этот вопрос можно изучить с помощью генетического анализа. В результате хромосомных перестроек многие гены в клетках этой линии содержатся в виде только одной функциональной копии, что сильно облегчает выделение рецессивных мутаций в сравнении с их выделением из полностью диплоидной линии. Кроме того, высокий внутриклеточный уровень сАМР препятствует росту этих клеток. Активируя аденилатциклазу с помощью холерного токсина и ингибируя фосфодиэстеразу сАМФ теофиллином, можно искусственно поднять в клетках уровень сАМР. В таких условиях будут расти лишь клетки, устойчивые к действию сАМР.

Таким способом вы выделили несколько устойчивых колоний, растущих в этих селективных условиях, и проверили в них активность А-киназы. Все они оказались дефектными по этому признаку. Примерно 10% устойчивых линий были полностью лишены А-киназной активности, у остальных она обнаружилась, но для ее активации требовалась очень высокая концентрация сАМР. Для дальнейшей характеристики устойчивых линий вы провели слияние их с родительскими клетками и проанализировали гибриды на устойчивость к обработке холерным токсином. Гибриды между родительскими клетками и клетками, лишенными активности А-киназы, оказались чувствительными к холерному токсину, что говорит о рецессивности их мутации. Напротив, гибриды родительских клеток с теми мутантами, у которых была изменена чувствительность А-киназы к сАМР, оказались резистентными к холерному токсину, следовательно, их мутации доминантны.

- А. Является ли А-киназа в этих клетках необходимым ферментом?
- Б. Фермент А-киназа – это тетрамер, состоящий из двух каталитических субъединиц (собственно протеинкиназы) и двух регуляторных (сАМР-связывающих) субъединиц. Предложите объяснение того факта, что в одних сАМР-резистентных линиях клеток мутации оказались рецессивными, а в других – доминантными.
- В. Подтверждают ли эти эксперименты мнение, что все эффекты сАМР в клетках хомячка реализуются с участием А-киназы?

12-22

В отличие от миозина скелетных мышц миозин гладких мышц взаимодействует с актином лишь тогда, когда его легкая цепь фосфорилирована. Фосфорилирование регулируется изменениями внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , эффект которого опосредуется кальмодулином. Вы выделили из гладкой мышцы киназу легких цепей миозина, но активность ее одинакова в присутствии и в отсутствие Ca^{2+} . Ваш коллега предлагает добавить ингибиторы протеаз, чтобы быть уверенным в сохранении интактности киназы в процессе выделения. При таких условиях получения киназная активность в экстракте обнаруживается только в присутствии Ca^{2+} и кальмодулина.

Вы проводите частичную очистку киназы методами гелевой фильтрации и ионообменной хроматографии, а затем, пользуясь методом аффинной хроматографии, пропускаете препарат через колонку с кальмодулином в присутствии Ca^{2+} . К вашей радости, вся киназная активность сорбируется на колонке, а затем количественно элюируется с нее при промывке раствором ЭГТА – агента, хелатирующего Ca^{2+} . Как видно из та-

Таблица 12-2. Активность киназы легких цепей миозина, выделенной в отсутствие и в присутствии ингибиторов протеаз (задача 12-22)

Способ выделения	Добавки к реакционной среде	Активность, %
Без ингибиторов	Без добавок	50
Без ингибиторов	Ca^{2+}	50
Без ингибиторов	Кальмодулин	50
Без ингибиторов	Ca^{2+} + кальмодулин	50
С ингибиторами	Без добавок	1
С ингибиторами	Ca^{2+}	1
С ингибиторами	Кальмодулин	1
С ингибиторами	Ca^{2+} + кальмодулин	100

12-2, очищенная киназа ведет себя, как и ожидалось; ее активность полностью зависит от наличия Ca^{2+} и кальмодулина. Воодушевленные таким успехом, вы пытаетесь «реанимировать» первоначально выделенный вами препарат фермента, пропуская его через колонку с кальмодулином. К вашему удивлению, киназа проходит через колонку независимо от того, добавлен Ca^{2+} или нет.

- A. Как вы объясните, почему первоначально выделенный фермент был активен независимо от присутствия Ca^{2+} и кальмодулина и не задерживался на колонке с кальмодулином при аффинной хроматографии?
- B. Опишите последовательность молекулярных событий, приводящих к сокращению гладких мышц. Начните со входа Ca^{2+} в цитоплазму.
- B. Как вы считаете, можно ли использовать аффинную хроматографию на колонке с кальмодулином в качестве первой стадии очистки киназы легких цепей миозина?

12-23 Главная функция тромбоцитов – это регуляция свертывания крови. Когда тромбоциты оказываются в контакте с состоящей из коллагеновых волокон базальной мембраной поврежденного кровеносного сосуда или с образовавшимся сгустком фибрина, они изменяют свою форму – из округлых гладких становятся покрытыми «шипам» (отростками) – и прилипают к поврежденному участку. Тогда же они начинают секретировать серотонин и АТР, стимулирующие аналогичные изменения во вновь прибывающих тромбоцитах, что приводит к быстрому образованию тромба. Реакция тромбоцитов регулируется путем фосфорилирования белков. В связи с этим тромбоциты содержат в больших количествах две протеинкиназы – протеинкиназу С и киназу легких цепей миозина; первая инициирует выброс серотонина, вторая – изменение формы тромбоцита.

При активации тромбоцитов тромбином происходит фосфорилирование легких цепей миозина и неидентифицированного белка с мол. массой 40 000 Да. Обработка тромбоцитов кальциевым ионофором приводит к фосфорилированию только легких цепей миозина, обработка же диацилглицеролом к фосфорилированию только белка с мол. массой 40 кДа. Эксперименты с использованием кальциевого ионофора и диацилглицерола в различных сочетаниях показали, что степень фосфорилирования указанного белка 40 кДа зависит только от концентрации диацилглицерола (рис. 12-10, А), высвобождение же

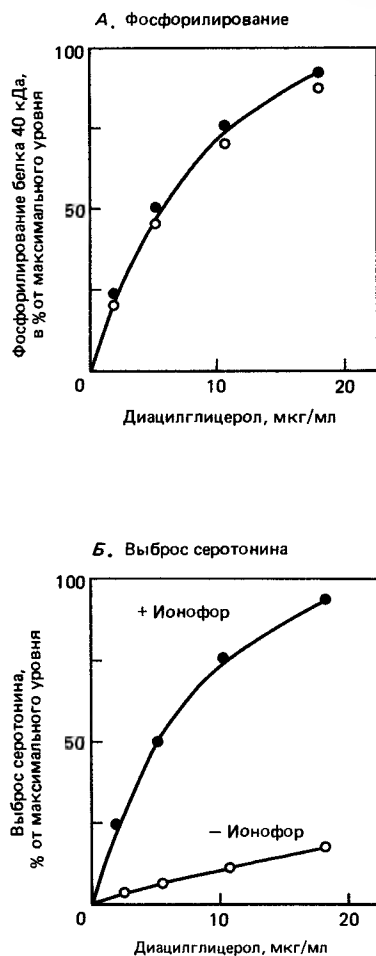


Рис. 12-10. Влияние обработки тромбоцитов Ca^{2+} -ионофором и диацилглицеролом на фосфорилирование белка 40 кДа (А) и на выброс серотонина (Б) (задача 12-23). Черные кружки – в присутствии кальциевого ионофора, светлые – в его отсутствие.

серотонина зависит как от диацилглицерола, так и от ионофора кальция (рис. 12-10, Б).

- А. Исходя из этих наблюдений опишите цель происходящих в норме молекулярных событий, ведущих к фосфорилированию легких цепей миозина и белка с мол. массой 40 кДа. Объясните, как влияет обработка диацилглицеролом и кальциевым ионофором на эти реакции.
- Б. Почему для секреции серотонина необходимы одновременно и ионофор, и диацилглицерол?

12-24

Удобным объектом для изучения компонентов, влияющих на внутриклеточный уровень Ca^{2+} , служат яйца морского ежа. В норме связывание со сперматозоидом вызывает увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , которое, в свою очередь, стимулирует экзоцитоз тысяч маленьких везикул, содержащих строительный материал для образования фертیلیзационной мембраны. Поскольку эту мембрану можно легко увидеть в световой микроскоп, ее формирование служит простым тестом на активацию яйца, дающим ответ типа «все или ничего». Яйцо можно активировать и без сперматозоида, если проинкубировать его в среде с кальциевым ионофором, содержащей также и ионы Ca^{2+} .

Узнав, что инозитолфосфаты освобождают Ca^{2+} из внутриклеточных запасов, вы тут же проверили их действие на яйца морского ежа. Действительно, когда вы инъецировали в яйцо 10^{-17} моль $(1,4,5)\text{InsP}_3$, образовалась фертیلیзационная мембрана. Однако активация зависела от наличия Ca^{2+} во внешней среде: добавление в среду ЭГТА – соединения, хелатирующего Ca^{2+} – препятствовало активации. Зависимость активации от наружного кальция была для вас неожиданной, потому что $(1,4,5)\text{InsP}_3$ не открывает кальциевые каналы в плазматической мембране. Другие инозитолтрисфосфаты – $(2,4,5)\text{InsP}_3$ и $(1,3,4)\text{InsP}_3$ – мобилизующие внутриклеточный Ca^{2+} в других клетках, при инъекции в яйца морского ежа активацию не вызывали. Неэффективен оказался в этом отношении и $(1,3,4,5)\text{InsP}_4$ – инозитолтетраakisфосфат. Однако при совместной инъекции «неактивных» инозитолфосфатов – $(2,4,5)\text{InsP}_3$ и $(1,3,4,5)\text{InsP}_4$ – наблюдалась полная активация. Смесь $(2,4,5)\text{InsP}_3$ с $(1,3,4)\text{InsP}_3$ была неактивной, равно как и комбинация из $(2,4,5)\text{InsP}_3$ со смесью изомеров InsP_4 случайного состава, не содержащей $(1,3,4,5)\text{InsP}_4$.

Эти результаты (табл. 12-3) поставили вас в тупик. Вы показываете их некоторым своим коллегам и спрашиваете у них совета. Один из них рассказывает вам, что слышал на семинаре о выделении инозитолкиназы, специфично фосфорилирующей инозитол и его производные по третьему положению. Этот обрывок информации все проясняет, теперь вы в состоянии сами разрешить вопросы, которые задавали коллегам.

- А. Почему одновременное введение $(2,4,5)\text{InsP}_3$ и $(1,3,4,5)\text{InsP}_4$ активирует яйца, но по отдельности эти вещества неэффективны?
- Б. Почему $(1,4,5)\text{InsP}_3$ способен «в одиночку» активировать яйца? Почему этого не может сделать смесь из $(2,4,5)\text{InsP}_3$ и $(1,3,4)\text{InsP}_3$?

12-25

Весьма наглядная иллюстрация одной хотя и второстепенной, но все же важной функции cAMP на уровне организма была

Таблица 12-3. Активация яиц морского ежа (задача 12-24)

Инъецированные инозитиды	Добавки к среде	Активация яиц
1. (1,4,5)InsP ₃	Без добавок	Нет
2. (1,4,5)InsP ₃	Ca ²⁺	Да
3. (1,4,5)InsP ₃	Ca ²⁺ и ЭГТА	Нет
4. (2,4,5)InsP ₃	Ca ²⁺	—»—
5. (1,3,4)InsP ₃	—»—	—»—
6. (1,3,4,5)InsP ₄	—»—	—»—
7. (2,4,5)InsP ₃ и (1,3,4,5)InsP ₄	—»—	Да
8. (2,4,5)InsP ₃ и (1,3,4)InsP ₃	—»—	Нет
9. (2,4,5)InsP ₃ и (w,x,y,z)InsP ₄ *	—»—	—»—

* (w,x,y,z)InsP₄ — смесь изомеров InsP₄ случайного состава.

получена в исследованиях, проводившихся на плодовой мушке *Drosophila melanogaster*. В одной из лабораторий в поисках гена фосфодиэстеразы сАМР проводили измерения содержания этого фермента у мух с хромосомными дупликациями или делециями и обнаружили заметные отклонения в тех случаях, когда мутации затрагивали сегменты 3D3 и 3D4 на X-хромосоме. Дупликации в этой области приводили к 1,5-кратному увеличению активности, делеции — к уменьшению активности вдвое. При делециях наблюдалось частичная стерильность самок.

В другой лаборатории того же института при изучении поведенческих мутантов дрозофилы обратили внимание на тот же участок X-хромосомы. Исследователи разработали тест на обучение, в котором мухам предлагали две металлические сетки, одна из которых находилась под током. Если сетка под током была намазана пахучим веществом, нормальные мухи быстро обучались избегать ее и продолжали это делать, даже когда ток отключали. В отличие от них мутантные мухи не научились избегать пахнущей сетки; они были названы *dunce*-мутантами. Мутация *dunce* (тупица) была генетически картирована и отнесена к сегментам 3D3 и 3D4. У мух, отобранных по этому признаку, наблюдалась также частичная стерильность самок.

Действительно ли этот дефект обучаемости — результат отсутствия фосфодиэстеразы сАМР или же просто соответствующие гены тесно связаны? Дальнейшие эксперименты показали, что у *dunce*-мутантов уровень сАМР в 1,6 раза выше, чем у нормальных мух. Кроме того, при центрифугировании гомогенатов нормальных мух и *dunce*-мутантов в градиенте сахарозы оказалось, что фосфодиэстераза сАМР в норме дает два пика, один из которых отсутствует у *dunce*-мутантов (рис. 12-11).

- Почему у *dunce*-мутантов уровень сАМР выше, чем у нормальных мух?
- Объясните, почему гомозиготные (дефект в обеих хромосомах) дупликации немутировавшего гена *dunce* вызывают увеличение содержания фосфодиэстеразы сАМР в 1,5 раза и почему гомо-

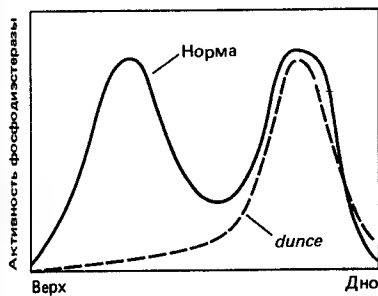


Рис. 12-11. Распределение активности фосфодиэстеразы сАМР при центрифугировании гомогенатов из нормальных мух и из *dunce*-мутантов в градиенте плотности сахарозы (задача 12-25).

зиготные делеции этого гена приводят к уменьшению активности фермента наполовину по сравнению с нормой?

- В. Предскажите действие кофеина, ингибитора фосфодиэстеразы, на способность к обучению у нормальных мух.
- Г. Доказывают ли эти эксперименты, что ген *dunce* является структурным геном фосфодиэстеразы cAMP? Если нет, то как еще можно их истолковать?

Адаптация клеток-мишеней (МБК 12.5)

12-26 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Клетки обратимо регулируют свою чувствительность к стимулу за счет процесса, называемого _____.
- Б. Опосредуемый рецепторами эндоцитоз лигандов часто сопряжен с уменьшением общего числа рецепторов клеточной поверхности, что связано с их ускоренной деградацией; этот механизм известен как _____.
- В. Когда рецепторы в присутствии лиганда интернализуются, но не разрушаются, клетки становятся менее чувствительными к добавленному лиганду; этот процесс называется _____.
- Г. У бактерий информация о присутствии во внешней среде аттрактантов и репеллентов передается через мембрану с помощью _____ четырех типов.

12-27 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Большинство рецепторов, подвергшихся эндоцитозу, доставляют свои лиганды в лизосомы, где те подвергаются деградации, а сами вновь возвращаются в мембрану (рециклируются).
- Б. Продолжительное действие на клетку какого-либо стимула вызывает потерю чувствительности к данному стимулу.
- В. Продолжительная инкубация фибробластов с простагландином E_1 (PGE_1) вызывает у них десенситизацию и к другим агентам, действующим через G_s -белок. Это явление называется гомологичной десенситизацией, поскольку оно имеет отношение к общему белку (G_s);
- Г. Наркоманам для обезболивания требуются более высокие дозы морфина, чем обычным людям, потому что у них утрачены функциональные G_i -белки, а не в результате регуляции путем уменьшения количества рецепторов.
- Д. Устройство жгутиков у *E. coli* и *S. typhimurium* таково, что клетки двигаются по прямой, когда их жгутики вращаются против часовой стрелки, и начинают беспорядочно кувыркаться при вращении жгутиков по часовой стрелке.
- Е. Если концентрация аттрактанта остается постоянной, бактерии продолжают двигаться по прямой.
- Ж. Хемотаксические рецепторы, активированные связанными лигандами, могут метилироваться, следствием чего будут их инактивация и увеличение частоты кувырканий клеток.

12-28 После продолжительной инкубации с гормонами, которые связываются с β -адренергическими рецепторами, клетки становятся рефрактерными и перестают реагировать на сигнал. Для изучения этого явления десенситизации вы используете новое вещество — CGP-12177, представляющее собой гидрофильную молекулу, специфически связывающуюся с β -адренорецептора-

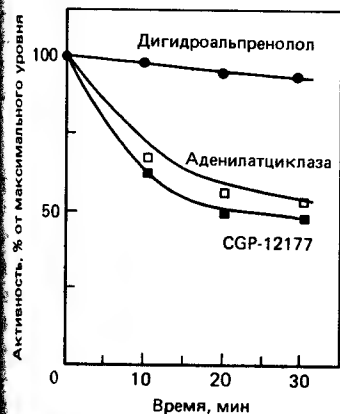


рис. 12-12. Активность аденилатциклазы, связывание ^3H -CGP-12177 и связывание ^3H -дигидроальпренолола в разные моменты времени после добавления к клеткам изопротеренола (задача 12-28). Все величины выражены в процентах от значения в нулевой момент времени.

12-29

ми. В отличие от связывания гидрофобного соединения дигидроальпренолола динамика связывания CGP-12177 в точности соответствует уменьшению гормон-зависимой активности аденилатциклазы, наблюдаемому при возрастании времени воздействия изопротеренола на клетки (рис. 12-12). Чтобы понять различие в связывании рецепторов с молекулами этих двух соединений, вы лизируете необработанные и обработанные изопротеренолом клетки, фракционируете их, центрифугируя в градиенте плотности сахарозы, и измеряете связывание дигидроальпренолола и CGP-12177 (рис. 12-13). Кроме связывания лигандов вы измеряете также активность маркера плазматических мембран — 5'-нуклеотидазы.

А. Объясните различия в связывании дигидроальпренолола и CGP-12177.

Б. Как вы думаете, что может лежать в основе десенситизации, вызываемой в этих клетках изопротеренолом?

Десенситизация — это весьма общее явление, которое выражается в снижении чувствительности клеток к гормону (или к другому агенту) после длительного контакта с ним. Когда ослабляется реакция только на десенситизирующий гормон (или на агент, действующий через тот же рецептор), десенситизация называется гомологичной. Если же падает чувствительность не только к десенситизирующему гормону, но и к веществам, действующим через другие рецепторы, эффект называют гетерологичной десенситизацией.

β -Адренергические рецепторы подвергаются и гомологичной, и гетерологичной десенситизации, причем в обоих случаях происходит фосфорилирование рецептора. Вы выделили две различные протеинкиназы, предположительно участвующие в процессе десенситизации β -адренорецептора. Каждая из этих киназ в подходящих условиях фосфорилирует очищенные β -адренорецепторы, встроенные в фосфолипидные везикулы. Один из ферментов, судя по всему, является А-киназой, поскольку для его активации необходим сАМР, активность же другого (который вы обозначили как неизвестный Х-киназой) нечувствительна ни к сАМР, ни к сGMP, ни к системам Ca^{2+} — кальмодулин или Ca^{2+} — диацилглицерол. Вы измеряете способность каждой из этих киназ фосфорилировать β -адренорецептор в присутствии и в отсутствие изопротеренола (активатора рецептора). Ваши результаты показаны на рис. 12-14.

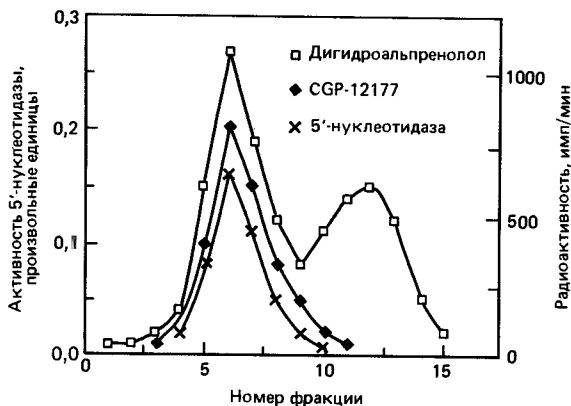


рис. 12-13. Связывание лигандов в экстрактах обработанных и необработанных изопротеренолом клеток по данным центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (задача 12-28).

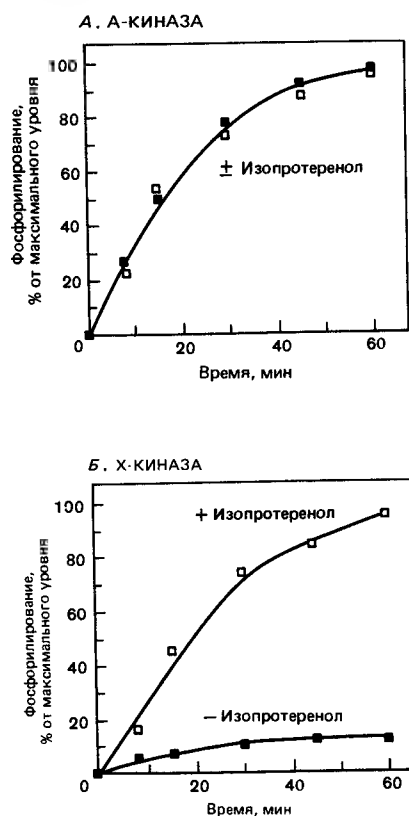


Рис. 12-14. Кинетика фосфорилирования β -адренергического рецептора А-киназой (А) и X-киназой (Б) в присутствии и в отсутствие изопротеренола (задача 12-29).

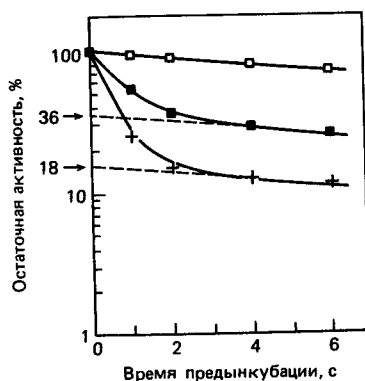


Рис. 12-15. Скорость десенситизации необработанного ацетилхолинового рецептора и двух препаратов фосфорилированного рецептора (задача 12-30). Стрелками показаны фракции фосфорилированных препаратов, сходные по свойствам с необработанным рецептором.

- А. Какая из двух киназ ответственна за гомологичную десенситизацию β -адренергических рецепторов, а какая за гетерологичную? Обоснуйте ваш ответ.
 Б. Предложите три механизма десенситизации за счет фосфорилирования β -адренорецептора.

12-30

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (нАХР) представляет собой регулируемый нейромедиатором ионный канал, построенный из субъединиц четырех типов. Рецептор фосфорилируется А-киназой, при этом один фосфат присоединяется к γ -субъединице и один к δ -субъединице. Полностью фосфорилированные рецепторы десенситизируются гораздо быстрее, чем нефосфорилированные. Чтобы детально изучить процесс десенситизации, вы проводите фосфорилирование двух препаратов рецептора в условиях различного насыщения фосфатом (0,8 моль фосфата на 1 моль рецептора и 1,2 моль фосфата на 1 моль рецептора) и измеряете развитие десенситизации в течение нескольких секунд (рис. 12-15). Оба препарата ведут себя как смесь разных форм рецептора: одна форма десенситизируется быстро (начальные крутые участки кривых), а другая с той же скоростью, что и нефосфорилированный рецептор.

- А. Считая, что реакции фосфорилирования γ - и δ -субъединиц протекают независимо и с равными скоростями, рассчитайте долю рецепторов, несущих 0, 1 и 2 остатка фосфата на молекулу в двух препаратах с разной степенью фосфорилированности.
 Б. Можно ли на основании этих данных решить, сколько фосфатных групп должно приходиться на рецептор, чтобы произошла десенситизация, — одна или две? Если вы установили, что достаточно одной фосфатной группы, укажите, должна ли она быть присоединена к какой-то определенной субъединице или к любой из двух?

12-31

У *E. coli* идентифицировано четыре типа хемотаксических рецепторов. Ими опосредуются хемотаксические реакции на различные аминокислоты, на сахара и на дипептиды. В качестве практической задачи по бактериальному хемотаксису преподаватель дал вам штамм бактерий дикого типа, у которого имеются рецепторы всех четырех типов, и четыре мутантных штамма, у каждого из которых недостает одного или более рецепторов. Вам нужно выяснить, на какой аттрактант реагирует каждый рецептор. Схема эксперимента очень проста: вы наполняете капиллярную пипетку раствором аттрактанта, погружаете ее в буфер, где находятся бактерии, через 5 минут вынимаете и подсчитываете бактерии в капилляре. Ваши результаты приведены в табл. 12-4. Определите, какому аттрактанту соответствует каждый из рецепторов.

12-32

Для выяснения взаимосвязи между структурой хемотаксического рецептора и такими его функциями, как узнавание стимула, передача сигнала и адаптация, вы клонировали ген рецептора аспартата из *Salmonella typhimurium*. Помимо нормального гена вы клонировали еще и мутантный ген, в котором недостает 30 аминокислот на С-конце. Вводя клонированные вами гены в нормальный (дикого типа) и укороченный — в мутантный штамм *Salmonella*, лишенный нормального гена для рецептора аспартата, вы можете изучать различия между двумя клонированными генами. К вашему удивлению, укороченный рецептор в клетках

Таблица 12-4. Хемотаксис у штамма дикого типа и мутантных штаммов *E. coli* (задача 12-31)

Штамм	Интактные рецепторы	Число клеток (тыс.) в капилляре				
		Серин	Аспартат	Рибоза	Полиглицин	Без добавок
1	Gap, Tar, Trg, Tsr	59	105	95	6,6	0,5
2	Tap, Tar, Trg	0,7	84	77	13	0,8
3	Trg, Tsr	34	0,7	59	0,6	0,6
4	Tap, Trg, Tsr	55	0,6	65	4,1	0,5
5	Tar, Trg, Tsr	70	59	85	0,9	0,8

не метилируется, хотя аминокислотные последовательности, по которым происходит метилирование у нормального рецептора, в нем сохранены. Оба клонированных рецептора связывают аспартат точно так же, как нормальный клеточный рецептор, лишь количество клонированных рецепторов на клетку в 15 раз больше, чем количество рецепторов в норме.

Чтобы понять, как клонированные рецепторы передают сигнал и каковы их адаптивные свойства, вы быстро меняете концентрацию аспартата в среде, где находятся бактерии. Бактерии дикого типа в отсутствие аттрактанта изменяют направление вращения (кувыркаются) каждые несколько секунд. При появлении же аттрактанта изменения в направлении вращения подавляются и бактерии какое-то время движутся по прямой, не кувыркаясь. Если концентрация аттрактанта остается неизменной (пусть даже высокой), бактерии дикого типа быстро адаптируются к ней и снова начинают кувыркаться через каждые несколько секунд. Чтобы можно было наблюдать эти изменения в поведении в условиях эксперимента, вы прикрепляете бактерии жгутиками к покровному стеклу и теперь можете сколько угодно наблюдать за тем, в каком направлении они вращаются. Затем вы добавляете в среду аспартат и подсчитываете (с минутными интервалами) число бактерий, которые ни разу не изменили направление вращения после добавки аттрактанта. Результаты, полученные как с клетками дикого типа, так и с клетками, несущими клонированные рецепторы аспартата, изображены на рис. 12-16.

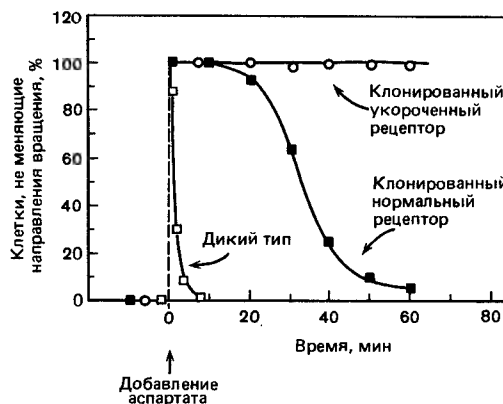


Рис. 12-16. Поведение клеток дикого типа и клеток, несущих клонированные рецепторы (задача 12-32).

- А. Является ли передача сигнала обоими клонированными рецепторами нормальной?
- Б. Отклоняются ли от нормы адаптивные свойства клонированных рецепторов?
- В. Предложите молекулярный механизм, объясняющий, почему при введении в бактерии клонированных генов рецепторы – и нормальный, и укороченный, – реагируют на сигнал иначе, чем нормальные рецепторы в бактериях дикого типа (рис. 12-16).

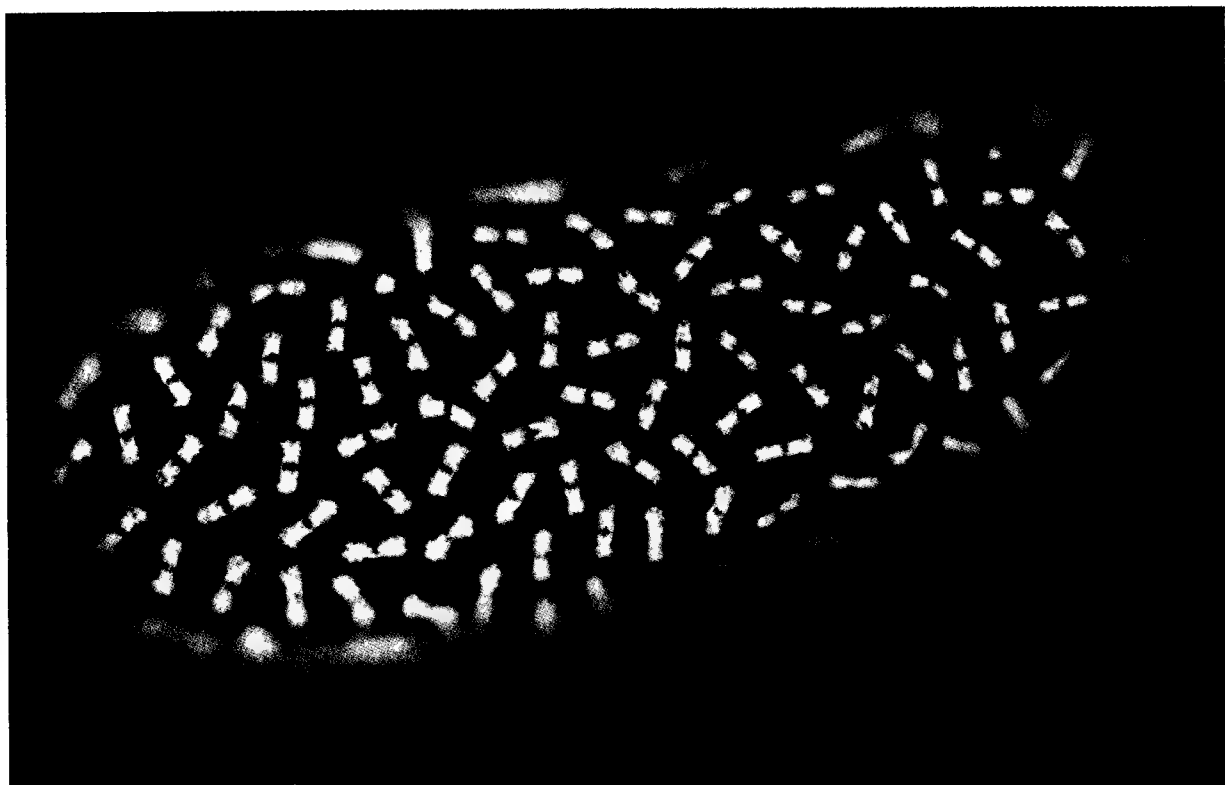


Рис. 13-1. Окрашивание зародыша *Drosophila*, находящегося на ранней стадии развития, с помощью анти-тел к тубулину позволяет видеть, благодаря полной синхронности деления клеток, сотни митотических веретен (Фотография любезно предоставлена Б. Албертсом).

Фазы клеточного цикла и их причинная взаимосвязь (МБК 13.1)

13-1 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Во время _____ содержимое ядра конденсируется с образованием видимых в микроскоп хромосом.
- Б. В процессе _____ клетка разделяется на две дочерние клетки.
- В. Легкодоступные для наблюдения события митоза и цитокинеза вместе занимают лишь короткий период клеточного цикла, называемый _____.
- Г. Интервал между последовательными митозами называется _____.
- Д. Период клеточного цикла, предназначенный для синтеза ДНК, называется _____.
- Е. Благодаря тому что клетки во время митоза принимают округлую форму и становятся слабо прикрепленными к культуральной под-

ложке, можно получить синхронную популяцию путем легкого встряхивания флакона и последующего отбора клеток (метод _____).

Ж. Цитоплазма клеток в фазе М содержит фактор, называемый _____; он может ввести ядро в состояние митоза на любой фазе клеточного цикла.

З. Дробящиеся яйца моллюсков, лягушек и морских ежей содержат белок _____, концентрация которого сначала равномерно повышается от нуля до некой величины, а с середины фазы М внезапно падает опять до нуля.

13-2 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

— А. Удвоение большинства клеточных компонентов в процессе деления клеток не требует строгого контроля.

— Б. Продолжительность клеточного цикла варьирует в зависимости от типа клеток, причем наибольшие различия относятся к фазе G_1 .

— В. В тканях животных измерить продолжительность клеточного цикла невозможно.

— Г. Синхронные популяции клеток можно получать с помощью центрифугирования.

— Д. В фазе G_1 клетки претерпевают переходное состояние, называемое точкой старта; оно связано с внутренними изменениями, приводящими к началу синтеза ДНК.

— Е. Скорости синтеза большинства белков изменяются в зависимости от стадии клеточного цикла.

— Ж. Если клетка в фазе S сливается с клеткой в ранней фазе G_1 , то в ядре, находящемся в фазе G_1 , немедленно начинается синтез ДНК.

— З. При слиянии клеток в фазе G_2 с клетками в фазе S в ядрах S-фазных клеток блокируется синтез ДНК. Это явление известно как блокада повторной репликации ДНК.

— И. При слиянии митотических клеток с клетками в любой другой фазе клеточного цикла все ядра в общей цитоплазме вступают в митоз.

— К. В нормальных клетках каждая стадия клеточного цикла зависит от правильного завершения предшествующей стадии.

— Л. Ни синтез РНК, ни синтез белка не являются необходимыми для вступления клеток в митоз.

— М. Созревание ооцитов *Xenopus* можно вызвать по крайней мере тремя способами: воздействием прогестерона, микроинъекцией белка MPF или микроинъекцией мРНК циклина.

13-3 Определение доли клеток, находящихся в митозе, (митотического индекса) — это общепринятый метод для оценки продолжительности клеточного цикла. Вы решили измерить клеточный цикл в печени взрослой мыши путем определения митотического индекса. С этой целью вы приготовили срезы печени и окрасили их для выявления митотических клеток. Через три дня при подсчете вы обнаружили только 3 митоза на 25 000 клеток. Предполагая, что фаза М длится 1 ч, рассчитайте продолжительность цикла в печени взрослой мыши.

13-4 Общую продолжительность клеточного цикла и доли в ней фаз G_1 , S, G_2 и М можно определить с использованием метода микроскопии и метода радиоавтографии. Рассмотрите, например, следующую серию экспериментов, поставленных для изучения клеточного цикла у L-клеток мыши.

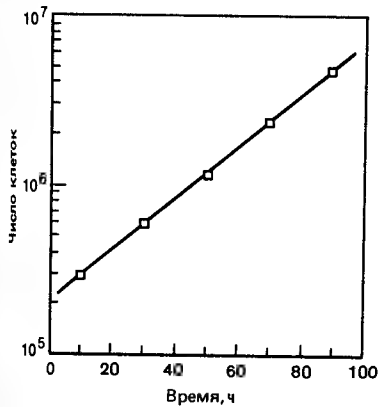


Рис. 13-1. Увеличение числа L-клеток мыши во времени (задача 13-4).

А. МЕЧЕННЫЕ МИТОЗЫ



Б. ЧИСЛО ЗЕРЕН СЕРЕБРА



Рис. 13-2. Число меченых митотических клеток как функция времени, прошедшего после добавления ^3H -тимидина (задача 13-4). А. Фракция меченых митотических клеток. Б. Среднее число зерен серебра над мечеными митотическими клетками.

- А. Общую продолжительность клеточного цикла измеряли по скорости роста популяции в экспоненциальной стадии. Для этого подсчитывали число клеток в пробах культуральной жидкости, отобранных в разные моменты времени (рис. 13-1). Какова общая продолжительность клеточного цикла у L-клеток мыши?
- Б. За исключением митоза, хорошо видимого в световом микроскопе и продолжающегося около 1 ч, определение длительности фаз клеточного цикла требует тщательного экспериментального анализа. В одном из таких экспериментов к асинхронно растущей клеточной популяции (со случайным распределением по клеточному циклу) добавляли ^3H -тимидин, затем через определенные промежутки времени клетки окрашивали и готовили для радиоавтографии. Клетки, включившие ^3H -тимидин, засвечивали фотоэмульсию, и над ними появлялись зерна серебра. На рис. 13-2, А изображена зависимость относительного количества меченых митотических клеток от времени, прошедшего после добавления ^3H -тимидина. На рис. 13-2, Б представлен график зависимости среднего числа зерен серебра над митотическими клетками от времени после добавления ^3H -тимидина. На основе этих данных и другой информации, содержащейся в задаче, определите продолжительность фаз G_1 , S и G_2 клеточного цикла L-клеток мыши и объясните ход своих рассуждений.

- 13-5 Для многих экспериментов желательно иметь популяцию клеток, проходящих клеточный цикл синхронно. Один из методов синхронизации, разработанный в числе первых и часто используемый до сих пор, — это так называемый метод двойной тимидиновой блокады. Если добавить к культуральной жидкости тимидин в высокой концентрации, то синтез ДНК в клетках прекращается. Избыток тимидина блокирует фермент рибонуклеотидредуктазу, преобразующий рибонуклеотиды в дезоксирибонуклеотиды. При ингибировании этого фермента количество дезоксирибонуклеотидов падает и синтез ДНК останавливается. Когда избыток тимидина удаляют, заменяя среду на новую, количество дезоксирибонуклеотидов увеличивается и синтез ДНК начинает идти нормально.

Для клеточной линии с 22-часовой продолжительностью клеточного цикла, где $M = 1$ ч, $G_1 = 10$ ч, $S = 7$ ч и $G_2 = 4$ ч, схема эксперимента по синхронизации методом двойной тимидиновой блокады должна быть следующей:

1. В 0 ч ($t = 0$ ч) добавить избыток тимидина.
 2. Через 18 ч ($t = 18$ ч) избыток тимидина удалить.
 3. Через 10 ч ($t = 28$ ч) добавить избыток тимидина.
 4. Через 16 ч ($t = 44$ ч) избыток тимидина удалить.
- А. В какой точке клеточного цикла находится популяция клеток, когда тимидин удаляют во второй раз?
- Б. Объясните, почему такая периодичность добавления и отмывания избытка тимидина позволяет синхронизировать клеточную популяцию?

- 13-6 Чем определяется длительность фазы S? Возможно, она зависит от количества содержащейся в ядре ДНК. Для проверки этого предположения вы измеряете длительность фазы S у ящерицы, лягушки и тритона, у которых содержание ДНК в клетках различно. Как показано в табл. 13-1, длительность фазы S возрастает с увеличением содержания ДНК.

Эти организмы сходны в том, что они холоднокровные. Однако это разные виды. Вы вспоминаете, что у лягушек можно

Таблица 13-1. Корреляция между продолжительностью фазы S и содержанием ДНК (задача 13-6)

Организм	Количество ДНК в ядре, шт	Продолжительность фазы S, ч
Ящерица	3,2	15
Лягушка	15	26
Тритон	45	41

получать гаплоидные зародыши, и повторяете свои измерения на гаплоидных и диплоидных клетках. Оказывается, что по продолжительности S-фазы гаплоидные клетки лягушки не отличаются от диплоидных. В литературе вы находите аналогичные данные для растений: тетраплоидные линии фасоли и овса имеют такую же продолжительность фазы S, что и их дальние диплоидные родственники.

Попробуйте объяснить эти на первый взгляд противоречащие один другому результаты. Почему при сравнении разных видов продолжительность фазы возрастает с увеличением содержания ДНК, а при увеличении содержания ДНК в пределах одного вида этот параметр не изменяется?

13-7 Ооциты лягушек созревают при инкубации с прогестероном. Это созревание сопровождается растворением ядра (так называемым разрывом зародышевого пузырька) и образованием мейотического веретена. Такое же действие, как и прогестерон, оказывает микроинъекция 50 нл цитоплазмы зрелого яйца в свежий ооцит (объемом 1000 нл), который после этого нормально созревает (рис. 13-3). В контрольном эксперименте с введением цитоплазмы из необработанных ооцитов в другие ооциты созревания, как и ожидалось, не наблюдается. Содержащийся в цитоплазме яйца фактор, ответственный за созревание, носит название MPF (maturation-or M-phase promoting factor); по-видимому, это белковый комплекс.

Для созревания, индуцированного прогестероном, необходим синтез белка, на что указывает чувствительность процесса к циклогексимиду, а в случае созревания под действием MPF это не так. Помещая ооциты, обработанные прогестероном, через разные промежутки времени после стимуляции в раствор с циклогексимидом, можно обнаружить, что созревание перестает зависеть от циклогексимида (больше не ингибируется им) за несколько часов.

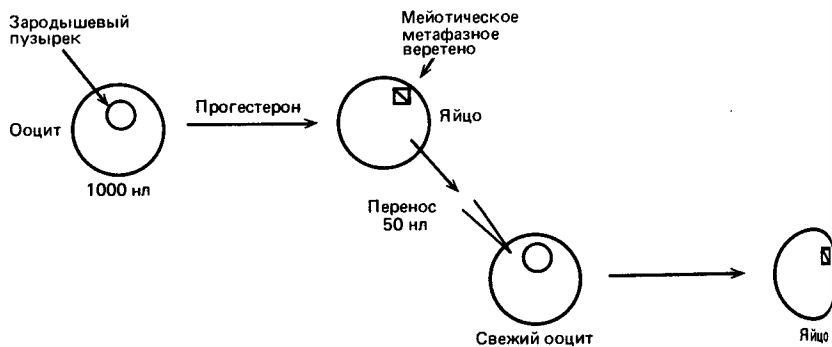


Рис. 13-3. Созревание ооцитов, индуцированное прогестероном и MPF (задача 13-7).

до того, как ооциты превращаются в яйца. Кроме того, момент времени, когда ооциты становятся нечувствительными к действию циклогексимида, совпадает с моментом появления активности MPF.

Чувствителен ли сам синтез MPF к действию циклогексимида? Чтобы проверить такую возможность, вы последовательно переносите MPF из яиц в ооциты и проверяете, уменьшается ли его активность с разбавлением. Сначала вы инъецируете 50 нл цитоплазмы из активированного яйца в незрелый ооцит; когда ооцит созревает в яйцо, вы переносите 50 нл его цитоплазмы в другой незрелый ооцит и т.д. К своему удивлению, вы раз за разом получаете эффект, повторяя эту процедуру по крайней мере 10 раз, даже если ооциты-реципиенты купаются в циклогексимиде! Более того, проявляемая активность MPF в последнем яйце точно такая же, что и в первом.

- А. Какой коэффициент разбавления вы получаете после 10 переносов по 50 нл в 1000 нл? Считаете ли вы, что биологическое действие соединения может не снижаться при таком падении концентрации?
- Б. Как может активность MPF, обусловленная отсутствующим в незрелых ооцитах белком, появляться в активированных яйцах, если белковый синтез блокирован циклогексимидом?
- В. Предложите механизм, за счет которого активность MPF могла бы сохраняться при повторных серийных переносах.
- Г. Какую роль должен играть циклогексимид-чувствительный фактор, необходимый для появления активности MPF в ооцитах, стимулированных прогестероном?

Дрожжи как модельная система (МБК 13.2)

13-8 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Микроорганизм *Saccharomyces cerevisiae* относится к _____.
- Б. Микроорганизм *Schizosaccharomyces pombe* относится к _____.
- В. Температурочувствительные мутанты не растут при _____ температуре, но растут при _____ температуре.
- Г. Мутации _____ у дрожжей вызывают блокирование либо нарушение той или иной части клеточного цикла.
- Д. В клеточном цикле дрожжей существует критическая точка, называемая _____, прохождение которой означает, что цикл клеточного деления будет обязательно завершен.

13-9 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Дрожжи важны для исследований клеточного цикла в первую очередь потому, что их можно выращивать в больших количествах, необходимых при биохимическом анализе.
- Б. Наиболее существенные регуляторы клеточного цикла у дрожжей — это тип питания и пол.
- В. У дрожжей ингибирование синтеза ДНК вызывает и прекращение цитокинеза; однако мутанты, не способные осуществлять цитокинез, могут многократно повторять цикл синтеза ДНК.
- Г. У клеток данного типа объем примерно пропорционален содержанию ДНК.
- Д. Гомологичные белки, кодируемые у *S. cerevisiae* геном *CDC28* и у *S. pombe* геном *CDC2⁺*, являются протеинкиназами.

- Е. Когда после голодания клетки дрожжей помещают в богатую питательную среду, они быстро проходят точку старта и возобновляют клеточный цикл.

13-10 Мутации, блокирующие ту или иную фазу клеточного цикла, очень важны для выявления механизмов его регуляции и контроля. У дрожжей выявлено большое количество таких мутаций. Обычно для характеристик мутантов по клеточному циклу (*cdc*) определяют сначала фазу, на которой блокирован цикл. Температурочувствительные *cdc*-мутанты особенно ценны, потому что они нормально растут при одной (пермиссивной) температуре, но проявляют мутантный фенотип при более высокой (рестриктивной) температуре. В одном из методов, применяемых для изучения температурочувствительных *cdc*-мутаций, используется гидроксимочевина — токсичное соединение, блокирующее синтез ДНК за счет ингибирования рибонуклеотидредуктазы (поставляющей предшественники дезоксирибонуклеотидов). Блокада синтеза ДНК гидроксимочевинной можно снять, просто заменив среду инкубации. Рассмотрим опыты с гипотетическими *cdc*-мутантами 101 и 102.

Вы инкубируете культуру мутанта *cdc101* дрожжей при рестриктивной температуре (37°C) в течение 2 ч (приблизительная продолжительность клеточного цикла у дрожжей) с тем, чтобы проявился мутантный фенотип. Затем вы переносите клетки в среду, содержащую гидроксимочевину, и инкубируете их при пермиссивной температуре (20°C). Клетки не делятся.

Изменив порядок обработки, вы инкубируете культуру мутанта *cdc101* при 20°C в течение 2 ч в среде, содержащей гидроксимочевину, а затем переносите клетки в среду без гидроксимочевины и инкубируете при 37°C. Клетки проходят один цикл деления.

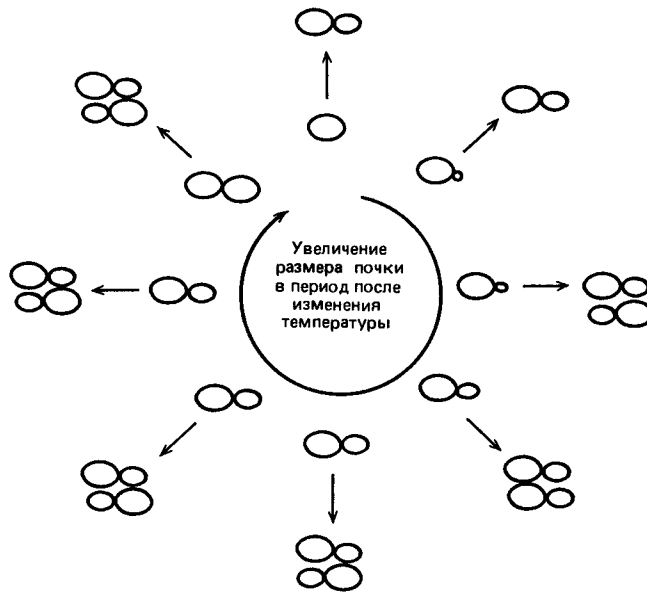
Вы повторяете эти два опыта с мутантом *cdc102*. Клетки делятся ни в одном случае.

- А. В какой фазе клеточного цикла блокирован мутант *cdc101* при рестриктивной температуре? Объясните результаты опытов обратной сменой температуры.
- Б. В какой фазе клеточного цикла блокирован мутант *cdc102* при рестриктивной температуре? Объясните результаты опытов обратной сменой температуры.

13-11 Вы выделили температурочувствительный мутантный штамм почкующихся дрожжей. Он хорошо растет при 25°C, но при 35°C все клетки образуют по крупной почке, а затем прекращают рост. К моменту прекращения роста клетки приобретают характерную морфологию (landmark morphology).

Синхронизировать рост клеток такого мутанта очень трудно, но вам хотелось бы как можно точнее установить, в какой точке клеточного цикла температурочувствительный продукт гена должен действовать, чтобы клетка завершила цикл. Критическая точка, где действует данный продукт, — это «точка удара» для мутанта. Один толковый приятель, у которого есть хороший микроскоп с нагревательным столиком и видеокамера для цифровой съемки, предлагает вам заснять клетки в поле зрения при повышении температуры и проследить таким способом за поведением отдельных клеток при остановке их роста. Поскольку это неподвижный организм, то относительно легко наблюдать изменения в индивидуальных клетках. Чтобы разобраться

Рис. 13-4. Цейтраферная съемка клеток температурочувствительного мутанта дрожжей (задача 13-11). Клетки во внутреннем круге расположены в порядке изменения размеров их почек, т.е. по фазам клеточного цикла. После инкубации при 35°C в течение 6 ч они превращаются в клетки, расположенные по внешнему кругу. Дальнейшего роста и деления не происходит.



в результатах наблюдений, вы располагаете фотографии клеток, относящиеся к началу опыта, по кругу в порядке увеличения размеров дочерних почек. Затем вы находите фотографии тех же клеток, сделанные через 6 ч, когда рост полностью прекратился. Результаты вашего опыта представлены на рис. 13-4.

- А. Укажите на рис. 13-4, где находится точка удара для мутанта.
- Б. Соответствует ли точка удара моменту остановки клеточного цикла у вашего мутанта? Что вы можете сказать по этому поводу?

Регуляция клеточного деления у многоклеточных организмов (МБК 13.3)

13-12 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. В конце фазы G_1 цикла деления клеток высших эукариот есть момент, после которого возврат в состояние покоя невозможен; он называется _____. В этой точке клеточного цикла возможна пауза, если условия среды препятствуют его продолжению.
- Б. Белки сыворотки крови, которые непосредственно и специфически стимулируют деление клеток, называются _____.
- В. Основной фактор в составе сыворотки крови, который делает фибробласты в тканевой культуре способными делиться, — это _____.
- Г. При культивировании нормальных клеток в суспензии, где они не прикреплены ни к какой твердой поверхности, деления почти никогда не происходит; это явление известно как _____.
- Д. При неблагоприятных для деления условиях клетки не проходят точку рестрикции и задерживаются в _____.
- Е. Фибробласты, взятые от нормального человеческого плода, совершают около 50 делений, затем прекращают делиться и погибают; это явление обусловлено _____.

13-13 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Время, необходимое клетке, чтобы пройти от начала фазы S до завершения митоза, — это более или менее постоянный параметр.
- Б. При дефиците основных питательных веществ клетки высших эукариот останавливаются в фазе G_1 клеточного цикла в точке соответствующей точке старта у дрожжей.
- В. Если бы клетки в ткани делились синхронно, то могла бы нарушиться целостность ткани, поскольку во время каждого митоза все клетки «округляются» и теряют контакт друг с другом.
- Г. Сыворотка крови поддерживает рост фибробластов, а плазма нет, поскольку в плазме содержатся факторы свертывания крови, тормозящие рост клеток.
- Д. Нетрансформированные клетки растут и делятся только в том случае, если они полностью распластаны на поверхности за счет прикрепления к субстрату; трансформированные клетки способны расти в суспензии, сохраняя округлую форму.
- Е. Регуляция клеточного деления, по-видимому, сопряжена с организацией цитоскелета.
- Ж. Утрата контроля за ростом у раковых клеток почти всегда связана с существенным увеличением клеточной адгезивности.
- З. В фазе G_1 клетки растут, а в фазе G_0 нет.
- И. В искусственной среде, содержащей специфические факторы роста, клетки из зародыша мыши растут лучше, чем в сыворотке крови; это свидетельствует о том, что сыворотка наряду со стимуляторами роста содержит также и ингибиторы роста.
- К. Люди с синдромом Вернера преждевременно старятся.

13-14 Случайность помогла провести продуктивную серию экспериментов. При пересадке линии культивируемых клеток вы потеряли одну из своих контактных линз; несколько дней спустя вы обнаружили линзу на дне чашки Петри. Интересно, что клетки, прикрепленные к линзе, были редко разбросаны и имели округлую форму, тогда как в других участках чашки они были распластаны и лежали почти плотно. «Ага! — подумали вы. Наверное, это наблюдение можно использовать для исследования зависимости между формой клеток и регуляцией роста». Как говорится, случай благоприятствует подготовленному уму.

Фирма-изготовитель любезно прислала вам образцы пластика poly(НЕМА), из которого были сделаны ваши мягкие контактные линзы. Если спиртовой раствор poly(НЕМА) капнуть на пластиковую культуральную чашку, то после испарения спирта на пластиковой поверхности остается тонкая твердая стерильная пленка прозрачного полимера. Приготовив серийные разведения спиртового раствора полимера и внося их одинаковые по объему образцы в разные чашки, вы получили ряд полимерных пленок с уменьшающейся толщиной. Оказалось, что чем тоньше пленка, тем сильнее клетки прикрепляются к чашке. Более того, с уменьшением толщины пленки происходит постепенное изменение формы клеток от округлой до плоской. Используя высоту клеток как показатель их формы (опускаем технические подробности), вы установили, что имеется прямая зависимость между формой клетки и ростовым потенциалом: чем более клетки уплощены, тем лучше они включают ^3H -тимидин.

Теперь главный вопрос: определяется ли зависимое от плотности торможение роста клеток изменениями формы клеток? Вы выращиваете различные по плотности (по степени конfluент-

ности клеток) культуры в обычных пластиковых чашках и измеряете высоту клеток и их способность включать ^3H -тимидин. Как показано в табл. 13-2, чем более тесно лежат клетки, тем больше их высота и тем хуже они включают ^3H -тимидин. С чем связано ухудшение роста: с увеличением скученности клеток или с изменением их формы? Для ответа на этот вопрос вы распределяете клетки при низкой плотности в чашках с пленкой poly(HEMA) так, чтобы высота клеток в каждой из разреженных культур соответствовала высоте клеток в соответствующей плотной культуре. Результаты ваших измерений по включению ^3H -тимидина в таких разреженных культурах приведены в табл. 13-2.

Таблица 13-2. Включение ^3H -тимидина клетками, растущими в обычных чашках и в чашках, обработанных poly(HEMA) (задача 13-14)

Тип чашки	Число клеток на чашку	Плотность расположения	Высота клеток, мкм	Включение ^3H -тимидина, имп/мин на 1 чашку
Необработанная	60 000	Почти плотно	6	15 200
Необработанная	200 000	Плотно	15	11 000
Необработанная	500 000	Плотно	22	3 500
Poly(HEMA)	30 000	Редко	6	7 500
Poly(HEMA)	30 000	Редко	15	1 500
Poly(HEMA)	30 000	Редко	22	210

Какой вывод могли бы вы сделать на основе результатов, представленных в табл. 13-2: коррелирует ли зависимое от плотности торможение роста клеток полностью, частично или не коррелирует вовсе с изменениями формы клеток? Обоснуйте ваше заключение.

- 13-15** Клетки позвоночных задерживаются в фазе G_1 клеточного цикла до тех пор, пока условия существования не станут благоприятными для вхождения в фазу S с последующим делением клетки. Некоторые потребности в факторах роста для прохождения фибробластами фазы G_1 были определены с использованием 3Т3-клеток мыши, представляющих собой фибробластоподобную линию. В отсутствие сыворотки крови эти клетки не вступают в фазу S, но если к культуре таких «остановленных» клеток добавить сыворотку, они проходят фазу G_1 и через 12 ч вступают в фазу S. Сыворотка может быть заменена тремя факторами роста: РФТ, ФРЭ и соматомедином С. Если три этих фактора вместе с соответствующими питательными веществами добавить к покоящимся клеткам, то через 12 ч они вступают в фазу S. Если хотя бы один из этих факторов отсутствует, клетки в фазу S не вступают.

Должны ли все эти три фактора роста присутствовать одновременно? Являются ли их эффекты независимыми, или же они стимулируют клетки, действуя поочередно в определенной последовательности? Чтобы ответить на эти вопросы, вы предварительно обрабатываете клетки факторами роста в определенной последовательности, а затем добавляете полноценную среду (содержащую сыворотку и питательные вещества) с ^3H -тимидином. Через определенные промежутки времени после этого вы

фиксируете клетки и проводите их радиоавтографию. Время появления первых меченых ядер вы отмечаете как время вхождения в фазу S. Результаты этого опыта представлены в табл. 13-3.

Необходимы ли эти факторы роста клеткам одновременно, независимо друг от друга или в определенной последовательности? Поясните ваш ответ.

Таблица 13-3. Влияние предварительной обработки 3Т3-клеток факторами роста на срок вхождения в фазу S (задача 13-15)

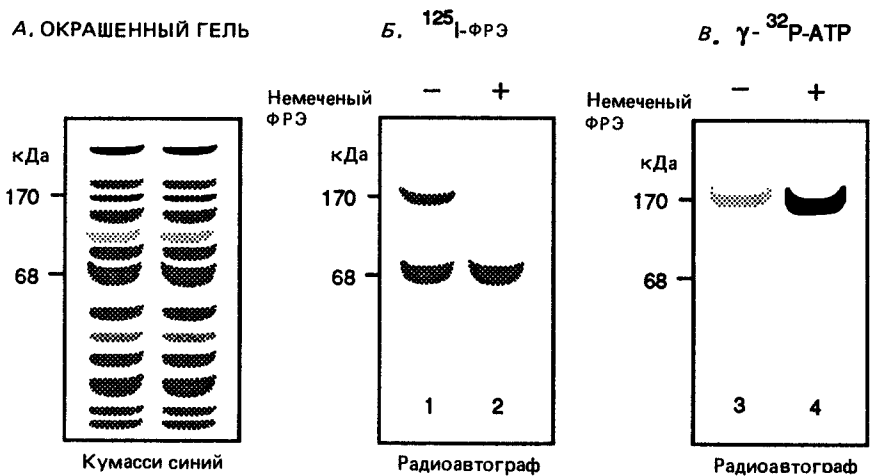
Опыт	Порядок добавления				Время до наступления фазы S
	1	2	3	4	
1	ФРЭ	РФТ	СомС	Среда	12 ч
2	ФРЭ	СомС	РФТ	—»—	12 ч
3	РФТ	ФРЭ	СомС	—»—	1 ч
4	РФТ	СомС	ФРЭ	—»—	6 ч
5	СомС	ФРЭ	РФТ	—»—	12 ч
6	СомС	РФТ	ФРЭ	—»—	6 ч

Клетки обрабатывали в течение 6 ч факторами роста, которые добавляли в указанном порядке. Перед добавлением следующего фактора роста клетки тщательно отмывали от предыдущего. После обработки факторами роста добавляли полную среду с ^3H -тимидином и определяли время появления метки в клеточных ядрах.

13-16 Молекулярные механизмы действия белковых факторов роста пока неясны, однако отдельные этапы процесса поддаются экспериментальному исследованию. Например, ФРЭ стимулирует пролиферацию эпителиальных клеток многих типов при первом связывании с рецепторами ФРЭ на их поверхности. Роль рецептора ФРЭ в распространении сигнала пролиферации теперь проясняется благодаря изучению самого рецептора. При этом широко используют клеточную линию А-431 мышинных фибробластов, содержащих необычайно большое число рецепторов ФРЭ, что существенно облегчает их исследование. Рассмотрим следующую серию экспериментов.

1. Препараты плазматических мембран из клеток А-431 содержат много белков, как показывает их анализ в ДСН-геле (рис. 13-5, А). Однако при добавлении к такому препарату ^{125}I -ФРЭ в присутствии агента, сшивающего белки, метку включают только два белка (рис. 13-5, Б, первая дорожка). При добавлении к среде инкубации избытка немеченого ФРЭ метка в полосе 170 кДа исчезает (рис. 13-5, Б, вторая дорожка).
2. Если препарат мембран инкубировать с γ - ^{32}P -АТР, то некоторые белки, в том числе и белок с мол. массой 170 кДа фосфорилируются. Включение в состав инкубационной смеси ФРЭ приводит к существенному ускорению этой реакции.
3. Если осадить белок 170 кДа с помощью специфичных к нему антител и затем повторить инкубацию осадка с γ - ^{32}P -АТР, то белок 170 кДа фосфорилируется в ходе ФРЭ-стимулируемой реакции (рис. 13-5, В, дорожка 3 и 4).
4. Если осажденный антителом белок вначале разгоняют в ДСН-геле, а затем ренатурируют в этом геле, то последующая

Рис. 13-5. Анализ рецептора ФРЭ (задача 13-16). **А.** ДСН-гель препарата мембран из клеток А-431. **Б.** ДСН-гель препарата мембран из клеток А-431, инкубированных с ^{125}I -ФРЭ и со сшивающим белки агентом в присутствии и в отсутствие избытка меченого ФРЭ. **В.** ДСН-гель осажденного с помощью антител рецептора ФРЭ, инкубированного с γ - ^{32}P -АТР в присутствии и в отсутствие ФРЭ.



инкубация с γ - ^{32}P -АТР в присутствии и в отсутствие ФРЭ приводит к такому же распределению, как приведенное на рис. 13-5, В.

- Какой из опытов наиболее четко демонстрирует, что белок с мол. массой 170 кДа является рецептором ФРЭ?
- Является ли рецептор ФРЭ субстратом для ФРЭ-стимулируемой протеинкиназы? Как это можно определить?
- Какие опыты показывают, что рецептор ФРЭ представляет собой протеинкиназу?
- Можно ли сделать вывод, что рецептор ФРЭ служит субстратом для своей собственной протеинкиназной активности?

- 13-17** Было высказано предположение, что ограниченность числа делений нормальных клеток (до примерно 50 циклов) лимитирует максимальные размеры опухолей и тем самым обеспечивается некоторая защита от рака. Приняв, что 10^8 клеток имеют массу 1 г, рассчитайте массу опухоли, возникающей при 50 делениях одной раковой клетки.

Гены «социального контроля» клеточного деления (МБК 13.4)

- 13-18** Заполните пропуски в следующих утверждениях.
- Клетки злокачественных опухолей проникают в другие ткани тела, давая начало вторичным опухолям, называемым _____.
 - Причиной возникновения опухолей некоторых типов служат _____, инфицирующие нормальные клетки.
 - Клетки, не испытывающие социального контроля деления и вытесняющие благодаря более быстрому росту нормальные клетки, называют _____.
 - Вирус саркомы Рауса относится к классу _____.
 - Некоторые гены, называемые _____, при попадании в нормальные клетки могут трансформировать их в раковые клетки.
 - Трансформирующий ген вируса саркомы Рауса обозначается _____.
 - Гены нормальных клеток, гомологичные онкогенам, называют _____.

- 13-19** Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.
- А. Для трансформированных клеток характерен целый ряд признаков, которые можно разбить на три группы: аномалии, связанные с плазматической мембраной, аномалии прикрепления и аномалии роста и деления.
 - Б. Трансформация клетки может быть вызвана одним геном.
 - В. Температурочувствительные мутанты по гену *v-src* из вируса саркомы Рауса были использованы для демонстрации того, что трансформирующий ген действует как переключатель в определенной точке клеточного цикла и в другое время не нужен для поддержания трансформированного состояния.
 - Г. При анализе трансформированных клеток на онкогены выявляются только доминантные онкогены.
 - Д. Рecessивные мутации генов социального контроля могут быть более распространенной причиной рака, чем доминантные мутации.
 - Е. В сущности все вирусные онкогены соответствуют либо естественным факторам роста, либо рецепторам естественных факторов роста.
 - Ж. По-видимому, большую роль в трансформации клеток играет тирозинспецифическая протеинкиназная активность, которой обладает продукт гена *v-src* вируса саркомы Рауса.
 - З. Продукт гена *v-src* прикрепляется к плазматической мембране коротким отрезком из гидрофобных аминокислот на N-конце полипептидной цепи.
 - И. Каким образом пролиферация клеток связана с их адгезией, неизвестно.
 - К. Нормальные клетки делятся только тогда, когда они плотно прикреплены к субстрату, а пролиферация трансформированных клеток существенно тормозится, если искусственно вызвать их прикрепление к субстрату.
 - Л. Одинаковые размеры органов и тела у тритонов с разной плоидностью указывают на то, что необходимый для регуляции размеров тела контроль клеточного деления может зависеть от «измерения» длины, а не от простого «подсчета» числа клеток или циклов деления.

13-20 Вирус саркомы Рауса (RSV) содержит онкоген *v-src*, который кодирует белок с мол. массой 60 кДа, известный как $p60^{src}$. Полагают, что этот белок вызывает трансформацию клеток, действуя в качестве тирозинспецифической протеинкиназы. $p60^{src}$ прикреплен к цитоплазматической поверхности плазматической мембраны посредством связанной с его N-концом миристиновой кислоты (жирная кислота C:14). Вы выделили мутант RSV, у которого $p60^{src}$ не связывается с миристиновой кислотой из-за изменения на N-конце. Чтобы определить значение этого связывания для трансформации, вы инфицируете клетки мутантным вирусом и вирусом дикого типа и сравниваете свойства инфицированных и неинфицированных клеток. Как видно из данных табл. 13-4, клетки, инфицированные мутантным вирусом, не проявляют почти ни одного классического симптома трансформации.

Анализ клеток, инфицированных мутантным вирусом, показывает, что они содержат много белка $p60^{src}$, однако он находится в цитоплазме, а не связан с мембраной. Тем не менее в клетках, инфицированных мутантным вирусом, и в клетках,

Таблица 13-4. Связанные с трансформацией свойства неинфицированных клеток и клеток, инфицированных RSV дикого типа или мутантным RSV (задача 13-20)

Признаки трансформации	Неинфицированные клетки	Клетки, инфицированные RSV дикого типа	Клетки, инфицированные мутантным RSV
Рост на мягком агаре	—	+++	—
Фибронектин	+++	—	+++
Активатор плазминогена	—	+++	—
Адгезионные пластинки	+++	—	+++
Повышение концентрации глюкозы	+	+++	+
Плотность насыщения, число клеток на чашку	$2 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^6$

зараженных вирусом дикого типа, наблюдается одинаково высокая тирозинкиназная активность, превышающая активность в неинфицированных клетках в 100 раз.

Вы удивлены и обескуражены таким результатом. Как может трансформация вызываться тирозинкиназной активностью, если она одинакова в случаях мутантного вируса и вируса дикого типа, а они при этом различаются по способности трансформировать клетки? Одно из объяснений может состоять в том, что ключевая мишень для фосфорилирования остается нефосфорилированной в случае мутанта по $p60^{src}$. Исходя из этого, вы анализируете известные мишени фосфорилирования для $p60^{src}$ в инфицированных клетках. Как видно из результатов, суммированных в табл. 13-5, различия между клетками, инфицированными мутантным вирусом, и клетками, содержащими вирус дикого типа, относительно малы. Даже несколько более низкие уровни фосфорилирования p36, p81 и лактатдегидрогеназы в клетках, инфицированных мутантным вирусом, по-видимому, не имеют значения, поскольку другие линии RSV, легко трансформирующие клетки, фосфорилируют эти отдельные белки в еще меньшей степени.

Таблица 13-5. Фосфорилирование белков в неинфицированных клетках и клетках, инфицированных RSV дикого типа или мутантным RSV (задача 13-20)

Фосфорилированный белок	Неинфицированные клетки	Клетки, инфицированные RSV дикого типа	Клетки, инфицированные мутантным RSV
Винкулин	4	100	800
p36	< 1	100	35
p81	< 1	100	30
Енолаза	< 1	100	100
Лактатдегидрогеназа	< 1	100	55
p50	< 1	100	100

А. Исключают ли эти результаты возможность того, что $p60^{src}$ вызывает трансформацию посредством своей тирозинкиназной активности? Поясните ваш ответ.

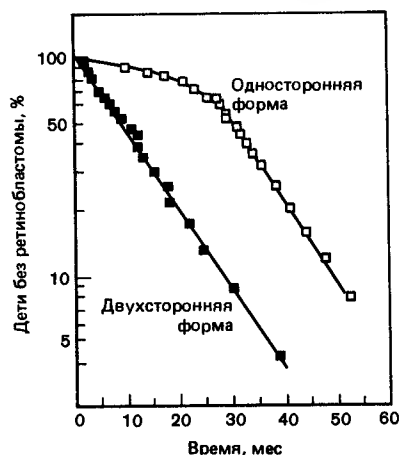


Рис. 13-6. Время появления признаков односторонней и двухсторонней ретинобластомы (задача 13-21). На графике представлены данные для популяции детей, у которых в том или ином возрасте развивается ретинобластома. Показана зависимость той доли популяции, в которой ретинобластома еще не возникла, от времени после рождения.

Б. Ясно, что связывание $p60^{src}$ с миристиновой кислотой и последующее прикрепление его к мембране имеют решающее значение для трансформации. Предложите два объяснения того, почему связывание с мембраной существенно для трансформации, вызываемой $p60^{src}$.

13-21 Ретинобластома — это чрезвычайно редкая разновидность рака нервных клеток глаза. Заболевание поражает преимущественно детей в возрасте до пяти лет, поскольку оно может возникнуть только тогда, когда нервные клетки еще делятся. Иногда опухоль поражает лишь один глаз, но бывает и так, что опухоли развиваются на обоих глазах. В последнем случае болезнь всегда носит наследуемый характер, тогда как поражение одного глаза чаще всего встречается в семьях, где раньше этого заболевания не было.

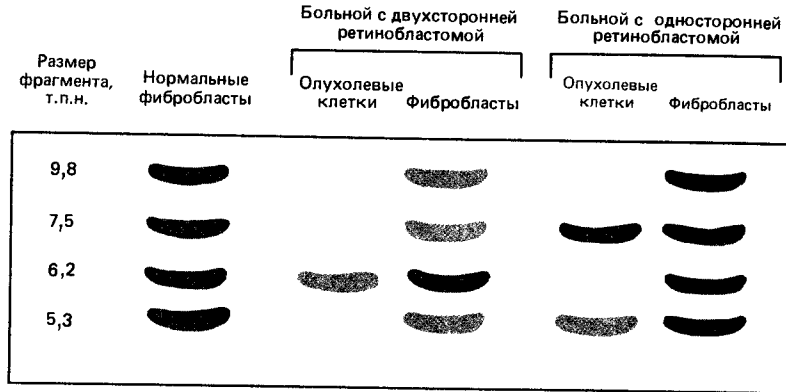
Если построить график зависимости той части детей, у которых заболевание еще не возникло, от возраста детей, то выявляется весьма информативное различие между двухсторонним и односторонним поражениями (рис. 13-6). В первом случае плавный ход кривой свидетельствует о том, что для возникновения двухсторонней ретинобластомы достаточно одного события. Напротив, наличие «плеча» на кривой для односторонней ретинобластомы говорит о том, что для возникновения такого поражения в одном нейроне должно произойти несколько событий. (Плечо указывает на то, что события накапливаются постепенно. Например, если необходимы два события, то в большинстве клеток в ранний период времени происходит только одно событие, что не приводит к возникновению опухоли. С течением времени возрастает вероятность, что в уже пораженной клетке случится второе событие и, следовательно, возникнет опухоль.)

Для объяснения этих наблюдений можно предположить следующее. Опухоль развивается в том случае, если обе копии гена ретинобластомы (*Rb*) утрачены или содержат мутации. В случае наследственной (двухсторонней) формы этого заболевания ребенок получает дефектный ген *Rb* от одного из родителей, и если в какой-либо нервной клетке одного глаза другая копия гена утрачивается в результате соматической мутации, то в этом глазу возникает опухоль. В действительности утрата копии гена случается довольно часто, поэтому опухоли обычно развиваются в обоих глазах. Если ребенок получает две хорошие копии гена *Rb*, то опухоль в глазу возникнет только в том случае, если в одной и той же клетке будут утрачены обе копии. Поскольку такая двойная потеря случается очень редко, то опухоль появляется обычно только на одном глазу.

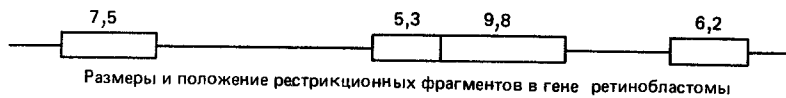
Чтобы проверить эту гипотезу, вы исследуете с помощью клонирования кДНК гена *Rb* структуру гена в клетках от здоровых людей и от больных с односторонней и двухсторонней ретинобластомой. Как показано на рис. 13-7, у здоровых людей имеются четыре рестрикционных фрагмента, которые гибридизуются с кДНК-зондом (это означает, что каждый из этих фрагментов содержит по крайней мере один экзон). Фибробласты (неопухлевые клетки) от обоих больных также содержат эти четыре фрагмента, хотя количество трех фрагментов от ребенка с двухсторонней ретинобластомой вдвое меньше, чем в норме. В опухолевых клетках обоих больных отсутствуют некоторые рестрикционные фрагменты.

Рис. 13-7. Результаты блот-гибридизации рестрикционных фрагментов гена ретинобластомы (задача 13-21). *А.* Картины гибридизации (Саузерн-блот) у здоровых людей и в случаях заболевания односторонней или двухсторонней ретинобластомой. Более светлая окраска полос указывает на вполнину меньшее, чем в норме, число копий. *Б.* Расположение рестрикционных фрагментов. Фрагменты, содержащие экзоны (показанные в виде прямоугольников), гибридизуются с кДНК, использованной в качестве зонда в этих опытах.

А. Саузерн-блот



Б. Рестрикционная карта



- Объясните, почему фибробласты и опухолевые клетки от одного и того же больного дают разные распределения полос?
- Какова структура генов *Rb* в фибробластах и опухолевых клетках от двух больных?
- Согласуются ли эти результаты с гипотезой о том, что ретинобластома обусловлена утратой гена *Rb*?
- Каким образом отсутствие продукта гена *Rb* может быть причиной развития ретинобластомы?

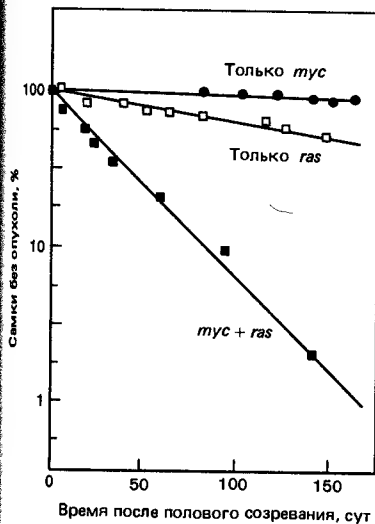


Рис. 13-8. Относительное количество самок мышей без опухоли как функция времени после полового созревания (задача 13-22).

13-22 Образование опухолей—это многостадийный процесс, который может включать в себя последовательную активацию нескольких онкогенов. Подтверждением такому представлению служит следующее наблюдение. Некоторые пары онкогенов, наиболее исследованными среди которых являются *ras* и *тус*, более эффективно трансформируют культивируемые клетки, чем каждый из них в отдельности. Подобные эксперименты с парами онкогенов теперь осуществлены на трансгенных мышах. В одном эксперименте онкоген *ras* был поставлен под контроль промотора MMTV (mouse mammary tumor virus—вирус опухоли молочной железы мышей) и введен в клетки зародышевой линии нескольким трансгенным мышам. Во втором опыте в такие клетки несколькими трансгенным животным был введен онкоген *тус* под контролем того же промотора MMTV. В третьем опыте мыши, содержащие одиночные онкогены, были спарены между собой для получения мышей с двумя онкогенами.

У всех трех групп мышей опухоли образовались с большей, чем в норме, частотой. У самок это проявилось быстрее, поскольку промотор MMTV, реагирующий на стероидные гормоны, включает введенные онкогены в ответ на гормональные изменения во время полового созревания.

На рис. 13-8 представлена зависимость скорости появления опухолей от времени после полового созревания.

- Предположим, что линии, проведенные по экспериментальным точкам, адекватно представляют экспериментальные данные.

- Сколько еще событий, кроме экспрессии онкогенов, должно произойти, чтобы возникла опухоль у мышей каждой из трех групп? (Возможно, вам захочется еще раз прочесть задачу 13-21.)
- Б. Достаточно ли активации клеточного протоонкогена *ras*, чтобы началось образование опухоли, если у мышей уже экспрессируется MMTV-регулируемый онкоген *тус* (и наоборот)?
 - В. Как вы думаете, почему у мышей, содержащих оба онкогена, скорость образования опухоли столь высока?

Механика клеточного деления (МБК 13.5)

13-23 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Характерная особенность митоза – реорганизация цитоскелета с образованием двухполюсного _____, состоящего из микротрубочек и ассоциированных с ними белков.
- Б. Главным центром организации микротрубочек в большинстве животных клеток является _____-скопление аморфного материала вокруг пары центриолей.
- В. Первая стадия митоза называется _____.
- Г. Реплицированные хромосомы прикрепляются к митотическому веретену посредством структур, называемых _____.
- Д. Сестринские хроматиды соединены вблизи их _____, которые содержат специфическую последовательность ДНК, необходимую для сегрегации хромосом.
- Е. Распад ядерной оболочки означает конец профазы и начало _____.
- Ж. В ходе митоза _____ начинается с внезапного синхронного разделения всех хромосом на сестринские хроматиды.
- З. Направленное к полюсам движение хромосом, связанное с укорочением микротрубочек кинетохора, носит название _____, а разделение самих полюсов, сопровождающееся удлинением полюсных микротрубочек, – _____.
- И. Конечная стадия митоза называется _____.
- К. Во время _____ происходит разделение цитоплазмы за счет процесса, называемого клеточным дроблением.
- Л. Первый заметный признак дробления животных клеток – это сморщивание и _____ в плазматической мембране во время анафазы.
- М. Дробление осуществляется за счет сокращения пучка актиновых филаментов, так называемого _____, примыкающего вплотную к плазматической мембране со стороны цитоплазмы.
- Н. Две дочерние клетки, возникшие в результате митотического деления, остаются связанными посредством структуры, называемой _____; оно состоит из фрагментов полюсных микротрубочек, заключенных в плотный матрикс.
- О. Образовавшуюся после деления поперечную стенку между двумя дочерними клетками у растений называют _____.
- П. В растительных клетках, завершающих деление, остаточные полюсные микротрубочки образуют открытую цилиндрическую структуру – так называемый _____, который направляет пузырьки, содержащие предшественники компонентов клеточной стенки, для использования их содержимого на формирование новой клеточной стенки.

13-24 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие – нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Начало фазы М обусловлено фосфорилированием белков, а конец - дефосфорилированием белков.
- Б. Хромосомы не принимают активного участия в митозе.
- В. Митоз поразительно единообразен во всех типах живых клеток.
- Г. У дрожжей примерно один раз на 100 000 клеточных делений происходит ошибка в движении хромосом: обе сестринские хромосомы движутся к одному полюсу (при этом другая дочерняя клетка остается без копии хромосомы).
- Д. По сравнению с высокодинамичными интерфазными микротрубочками те микротрубочки, нуклеация которых произошла в митотическом веретене, существенно более стабильны.
- Е. Если для дрожжей типичны очень маленькие центромеры, то у млекопитающих они гораздо больше по длине, поскольку кодируют белки кинетохора.
- Ж. Микротрубочки, отходящие от хромосом к полюсам веретена, необычайно стабильны, потому что их (+)-концы прикрыты кинетохором, а (-)-концы - центросомой.
- З. Упорядоченное расположение хромосом в метафазной пластинке - это главным образом результат действия тянущей силы, создаваемой кинетохорными микротрубочками.
- И. Некоторые данные свидетельствуют о том, что митотические хромосомы разделяются в начале анафазы на сестринские хроматиды в результате повышения концентрации Ca^{2+} в цитозоле.
- К. При добавлении к клеткам в анафазе таксола или D_2O прекращается движение хромосом к полюсам, но не расхождение полюсов.
- Л. В отличие от анафазы А протекание анафазы Б ингибируется агентами, действующими на актин и миозин; это говорит о том, что анафаза Б зависит от системы движения на основе актина.
- М. Бесклеточные экстракты яиц *Xenopus* могут образовывать ядра вокруг ДНК любого происхождения при условии, что она содержит эукариотическую центромерную последовательность.
- Н. При цитокинезе плоскость деления клетки определяется положением во время митоза метафазной пластинки, которая каким-то образом организует актиновые филаменты, составляющие сократимое кольцо.
- О. Механизм цитокинеза в растительных клетках существенно отличается от описанного для животных клеток: у растений внутри материнской клетки строится новая клеточная стенка, разделяющая две дочерние клетки.
- П. В митозе не существует никаких специальных механизмов для наследования митохондрий.
- Р. У многих одноклеточных организмов митоз осуществляется без разрушения ядерной оболочки.

13-25 Из многих дрожжевых хромосом были выделены последовательности ДНК, важные для функции центромеры. Эти центромерные последовательности сообщают самореплицирующимся кольцевым плазмидам в клетках дрожжей два свойства, характерные для хромосом. В результате их встраивания, во-первых, уменьшается число копий плазмид на клетку до одной или двух и, во-вторых, осуществляется правильная сегрегация в митозе, так что каждой дочерней клетке передается по одной плазмиде.

Что произойдет, если две такие последовательности будут присутствовать в одной и той же молекуле ДНК? У высших

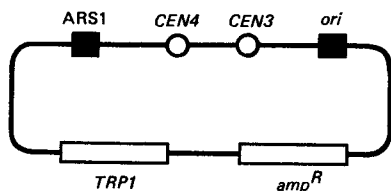


Рис. 13-9. Структура дицентричной плазмиды (задача 13-25). *CEN3* и *CEN4*—это центромерные последовательности дрожжевых хромосом 3 и 4 соответственно.

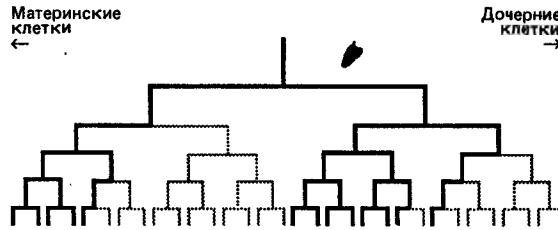
эукариот редкие хромосомы, содержащие две центромеры в разных положениях, крайне нестабильны: они буквально разрываются на части в анафазе, когда происходит расхождение хромосом. Дрожжевые хромосомы, однако, слишком малы, чтобы их можно было исследовать под микроскопом. Следовательно, для ответа на этот вопрос нужно использовать другие способы, в данном случае—клонирование и рестрикционное картирование.

Вы конструируете плазмиду с двумя центромерными последовательностями, как это показано на рис. 13-9. Для размножения такой плазмиды в бактериях необходимы репликационная последовательность бактериального происхождения (*ori*) и селективный маркер (*amp^R*), а для размножения в дрожжах—репликационная последовательность дрожжевого происхождения (*ARS1*) и селективный маркер (*TRP1*). Вы накапливаете такие плазмиды, размножая их в *E. coli*. Подобная плазмида трансформирует дрожжи примерно с той же эффективностью, что и плазмида, содержащая одну центромерную последовательность. Тем не менее колонии клеток, трансформированных с помощью дицентричной плазмиды, существенно варьируют по размеру, тогда как при трансформации с использованием моноцентричной плазмиды колонии не отличаются друг от друга. Вы обнаруживаете, что в первом случае клетки во всех крупных колониях содержат плазмиды с одной центромерной последовательностью, тогда как клетки мелких колоний содержат плазмиды, утратившие обе центромерные последовательности. Ни в одной колонии вы не обнаруживаете клеток с плазмидами, содержащими две исходные центромерные последовательности. В противоположность этому колонии клеток, трансформированных моноцентричной плазмидой, неизменно содержат интактные плазмиды.

- A. Почему дицентричные плазмиды, крайне нестабильные в дрожжах, устойчивы в бактериях?
- B. Почему дицентричные плазмиды нестабильны в дрожжах?
- V. Предложите механизм удаления одной из центромерных последовательностей из дицентричных плазмид в дрожжах. Может ли такой механизм быть причиной потери обеих центромерных последовательностей в некоторых плазмидах?

13-26 Кольцевые дрожжевые плазмиды, содержащие точку начала репликации, но лишённые центромеры, особым образом распределяются по отдельным клеткам. При культивировании клеток в условиях, когда требуется синтез кодируемого плазмидой продукта, только от 5 до 25% клеток содержат плазмиды. В то же время число копий плазмид в этих несущих плазмиды клетках составляет от 20 до 50 на клетку. Чтобы разрешить кажущийся парадокс—большое среднее число копий при малой численности содержащих плазмиды клеток,—вы проводите анализ родословной, намереваясь выяснить порядок распределения плазмид в митозе. Эксперимент основан на использовании штамма дрожжей, нуждающихся в гистидине, и плазмиды, содержащей ген синтеза гистидина, которого нет у клетки-хозяина. Штамм, несущий плазмиду, хорошо растёт в селективных условиях, т. е. при отсутствии в среде гистидина. С помощью микроманипулятора вы разделяете материнские и дочерние клетки на протяжении пяти циклов делений в селективной среде, а затем определяете число клеток, способных образовать колонию. На рис. 13-10

Рис. 13-10. Анализ родословной, показывающий наследование плазмиды, содержащей точку начала репликации и селективный гистидиновый маркер (задача 13-26). Жирными линиями показаны клетки, содержащие плазмиду, а прерывистыми — не содержащие ее. Для каждого деления материнские клетки изображены слева, а дочерные — справа.



такие клетки обозначены жирными линиями, а клетки, неспособные образовывать колонии, прерывистыми линиями.

- А. Анализ родословной показывает, что клетки, у которых отсутствует плазмида, в течение нескольких делений могут расти на селективной среде. За счет чего это может происходить?
- Б. Распределяются ли плазмиды поровну между материнской и дочерней клетками?
- В. Если считать, что плазмиды, подобно хромосомам, реплицируются в дрожжевых клетках только один раз за клеточный цикл, то как может приходиться от 20 до 50 плазмидных молекул на одну несущую плазмиду клетку?
- Г. При росте в селективных условиях клетки, содержащие плазмиды с одной центромерой (1–2 плазмиды на клетку), образуют крупные колонии, а клетки с плазмидами без центромер (20–50 плазмид на клетку) образуют мелкие колонии (см. задачу 13-25). Может ли анализ родословной помочь в объяснении этого различия?

13-27 Одним из наименее понятных аспектов клеточного цикла является репродукция полюсов веретена. Как показано на рис. 13-11, в начале митоза центросома обычно расщепляется с образованием двух полюсов веретена, которые организуют расхождение хромосом. Во время следующей интерфазы пара центриолей в центросоме дублируется, с тем чтобы центросома смогла расщепиться в следующем митозе. В норме цикл дупликации и расщепления центросомы согласуется по времени с делением клетки, так что все клетки имеют возможность образовать двухполюсное веретено. Однако, как было показано в опытах,

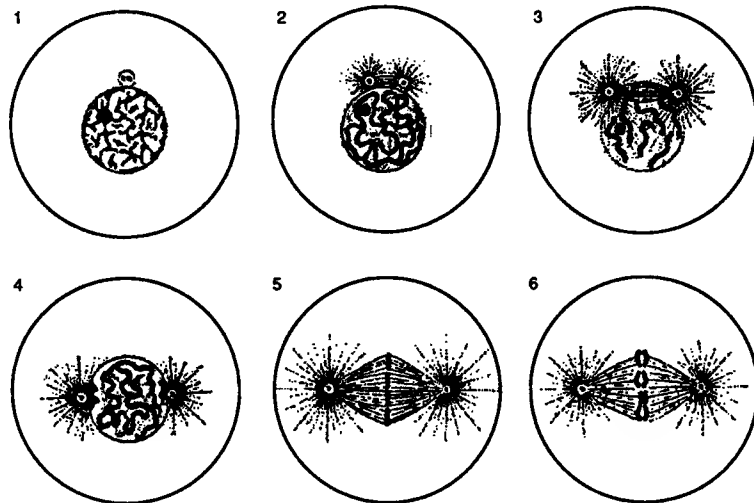
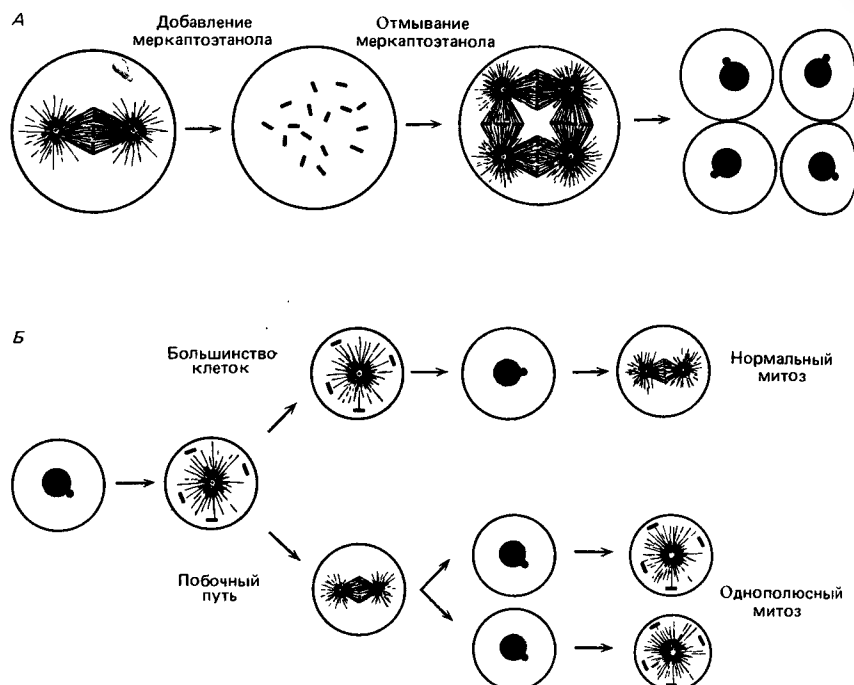


Рис. 13-11. Нормальный процесс расщепления центросомы с образованием двухполюсного веретена в митозе (задача 13-27). По E. B. Wilson, *The Cell in Development and Inheritance*, 1st ed., 1896. Figures 19 and 20. New York and London: Johnson Reprint Corporation, 1966.

Рис. 13-12. Аномальные веретена и митозы, вызванные обработкой меркаптоэтанолом (задача 13-27). **А.** Образование четырехполюсных веретен и деление на четыре клетки в результате обработки оплодотворенных яиц морского ежа меркаптоэтанолом. **Б.** Основной и побочный пути формирования веретена и деления дочерних клеток, образовавшихся после деления на четыре клетки.



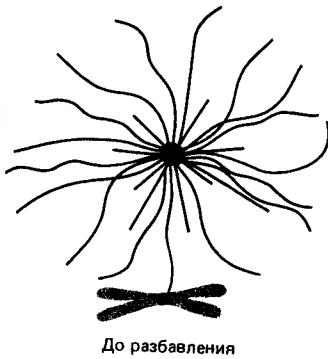
осуществленных в конце 50-х годов, при определенных условиях два цикла могут пройти асинхронно.

Если оплодотворенное яйцо морского ежа на стадии метафазы первого митотического деления обработать меркаптоэтанолом, то митотическое веретено исчезнет (рис. 13-12, А). (Неизвестно, в чем состоит действие меркаптоэтанолом, но оно обратимо.) Пока яйца инкубируют в присутствии меркаптоэтанолом, ядро не восстанавливается, синтез ДНК не происходит и хромосомы остаются конденсированными. После отмывания меркаптоэтанолом веретено восстанавливается и клеточное деление продолжается. При этом у некоторых яиц восстанавливается двухполюсное веретено, и они нормально делятся, однако в большинстве яиц образуется четырехполюсное веретено, и они делятся на четыре дочерние клетки (рис. 13-12, А). Независимо от продолжительности экспозиции в меркаптоэтанолом они никогда не делятся более чем на четыре клетки.

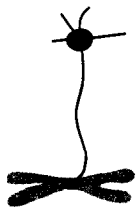
Четыре дочерние клетки, образовавшиеся таким образом из одной, восстанавливают ядра и переходят к следующему циклу деления; однако в митозе у них образуется однополюсное веретено. В большинстве случаев такие клетки пребывают в митозе несколько дольше, чем обычно, затем хромосомы в них деконденсируются, веретено исчезает и восстанавливается ядро (рис. 13-12, Б). При следующем митозе эти клетки образуют нормальное двухполюсное веретено и нормально делятся (рис. 13-12, Б). Однако дочерние клетки от такого деления опять образуют однополюсное веретено в следующем митозе (рис. 13-12, Б).

Опишите схему дупликации и расщепления центриолей в соответствии с картиной, представленной на рис. 13-12.

13-28 Во время митоза микротрубочки, прикрепляющие centrosомы к кинетохорам, направляют и притягивают хромосомы к полю-



До разбавления



После разбавления

Рис. 13-13. Расположение центросом, хромосом и микротрубочек до и после разбавления до низкой концентрации тубулина (задача 13-28).

сам. Каким должно быть расположение микротрубочек, чтобы этот процесс мог осуществляться? Какой способ соединения обеспечивает согласованное движение веретен и хромосом? После многих остроумно поставленных опытов картина все еще остается неясной.

Тем не менее эксперименты все же прояснили некоторые аспекты соединения между центросомами и хромосомами. Рассмотрим следующий опыт. Для инициации роста микротрубочек использовали центросомы, а затем добавляли хромосомы. Хромосомы прикреплялись к свободным концам микротрубочек, как показано на рис. 13-13. Далее комплекс разбавляли до очень низкой концентрации тубулина (рис. 13-13) и снова исследовали. Очевидно, что стабильными после разбавления оставались только связанные микротрубочки.

- А. Почему, как вы думаете, связанные микротрубочки стабильны?
- Б. Назовите причину исчезновения несвязанных микротрубочек после разбавления. Отщепляются ли они от центросомы, деполимеризуются с конца или разрушение происходит в их произвольных отрезках?
- В. Может ли временная последовательность событий после разбавления указать на механизм исчезновения микротрубочек?

13-29 Когда клетки делятся после митоза, площадь их поверхности увеличивается — естественное следствие деления данного объема на две части. Соответственно должна увеличиться площадь плазматической мембраны. Это увеличение можно оценить, сделав определенные допущения относительно геометрии клеточного деления. Допустим, что родительская клетка и две дочерние имеют сферическую форму. Тогда можно воспользоваться известными уравнениями объема и площади поверхности сферы:

$$\text{Объем} = \frac{4}{3}\pi r^3,$$

$$\text{Площадь поверхности} = 4\pi r^2.$$

- А. Рассчитайте увеличение плазматической мембраны при делении, считая, что дочерние клетки равны по размерам. (Эту задачу можно решить алгебраически, но для простоты вы можете подставить действительные числа, приняв, например, объем материнской клетки за 1). Как вы считаете, представляет ли такое увеличение площади мембраны определенную трудность для клетки? Объясните ваш ответ.
- Б. На ранних стадиях развития большинство оплодотворенных яиц делятся, не увеличиваясь в объеме. Например, в яйцах *Xenopus* происходит 12 циклов деления до того, как начинается рост и увеличение общего объема клеток. Допустив опять, что форма всех клеток сферическая и размеры их одинаковы, вычислите, насколько увеличивается площадь поверхности плазматической мембраны на ранней стадии развития зародыша от одной крупной клетки (яйца) до 4096 мелких клеток (12 делений).

13-30 Цитокинез — процесс собственно клеточного деления — привлекает внимание ученых на протяжении более чем ста лет. Как уже отмечалось, предложены всевозможные объяснения цитокинеза; задача состоит в том, чтобы решить, какое из них является верным. Рассмотрим следующие три гипотезы цитокинеза.

1. *Хромосомная сигнализация.* Хромосомы при расщеплении в анафазе испускают сигнал, воспринимаемый близлежащей

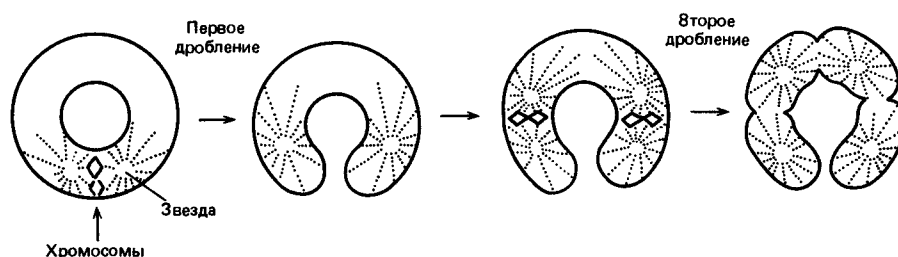


Рис. 13-14. Первое и второе деления тороидального яйца плоского морского ежа (задача 13-30).

клеточной поверхностью и инициирующий образование борозды деления.

2. *Полосная релаксация.* Звезды снимают натяжение в ближайших к ним участках клеточной поверхности (области полюсов), что дает возможность участку мембраны, наиболее удаленному от полюсов (в экваториальной плоскости), сократиться и начать образование борозды деления.
3. *Стимуляция звездами.* Звезды стимулируют сокращение в районе клеточной поверхности, где перекрываются противоположно направленные нити веретена (т.е. в экваториальной плоскости), вызывая таким образом образование борозды деления.

Эти гипотезы проверяли многими способами. Один особенно информативный эксперимент состоял в том, что стеклянный шарик вдавливали в центр дробящегося яйца плоского морского ежа так, чтобы оно деформировалось с образованием тора (форма бублика). При первом делении, как показано на рис. 13-14, образуется одна колбасовидная клетка, при втором делении она разделяется на четыре клетки.

- А. Каковы должны быть результаты этого опыта согласно гипотезе хромосомной сигнализации? Совпадают ли с предсказаниями полученные данные?
- Б. Какими должны быть результаты опыта в соответствии с гипотезой полюсной релаксации? Сходятся ли предсказания с данными, полученными в эксперименте?
- В. Что предсказывает гипотеза стимуляции звездами? Сходятся ли предсказания с экспериментальными данными?

Клеточная адгезия, соединения между клетками и внеклеточный матрикс

Межклеточные соединения (МБК 14.1)

14-1 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Ткань в виде пласта клеток называется _____.
- Б. Специализированные контакты между клетками можно разбить на три основные группы: _____ контакты, делающие зазоры между клетками непроницаемыми; _____ контакты, механически соединяющие клетки и их цитоскелеты друг с другом или с внеклеточным матриксом, и _____ контакты, через которые малые молекулы могут проходить из одной клетки в другую.
- В. Кальций-зависимые контакты, герметизирующие слои эпителия так, что молекулы не могут проникать с одной стороны слоя на другую, называют _____ контактами.
- Г. Эпителиальные клетки кишечника имеют на своей _____ поверхности, обращенной в просвет кишечника, один набор белков-переносчиков, а на _____ поверхности, обращенной кнаружи от просвета кишки, другой набор белков-переносчиков.
- Д. Актиновые филаменты соседних клеток связаны _____ контактами, которые состоят из трансмембранных линкерных белков, удерживающих клетки вместе, и внутриклеточных белков прикрепления, которые соединяют актиновые филаменты с линкерными белками.
- Е. Эпителиальные клетки соединены структурой, похожей на пояс и называемой _____ : с его помощью, по всей вероятности, осуществляется изгибание клеточных пластов в трубки в процессе морфогенеза у животных.
- Ж. Кальций-зависимые линкерные гликопротеины, участвующие в адгезии клеток эпителия, образуют семейство адгезионных молекул, называемых _____.
- З. _____ — это главный компонент комплекса внутриклеточных белков прикрепления, ответственный за прикрепление актина к трансмембранным линкерным гликопротеинам.
- И. Культивируемые фибробласты прикрепляются к субстрату специализированными участками плазматической мембраны — _____, которые связывают актиновые филаменты с внеклеточным матриксом.
- К. _____ — это межклеточные контакты типа заклепок: они служат местами прикрепления промежуточных волокон, помогая клеткам удерживаться вместе.
- Л. Базальная поверхность эпителиальной клетки соединена с базальной мембраной _____, которые скрепляют промежуточные филаменты с внеклеточным матриксом.
- М. Самым распространенным типом коммуникационных контактов между клетками является _____; он позволяет веществам с мол. массой до 1000 Да свободно проходить из клетки в клетку.

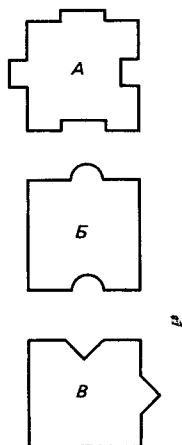


Рис. 14-1. Мономерные белки мембран (задача 14-3).

Н. Белковые структуры, которые соединяют содержимое соседних клеток водными каналами, называют _____.

14-2 Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие – нет. Если утверждение неверно, объясните почему.

- А. Плотные контакты получили такое название из-за своей способности соединять клетки так плотно, что их нельзя разъединить механическим усилием.
- Б. Направленное перекачивание питательных веществ через эпителий было бы невозможным, если бы белки на апикальной и базолатеральной поверхностях были одинаковыми.
- В. Пласты эпителиальных клеток существенно различаются по проницаемости своих плотных контактов, например эпителий мочевого пузыря более проницаем для ионов, чем эпителий кишечника.
- Г. Когда из среды, омывающей эпителий, удаляют Ca^{2+} , клетки «отклеиваются» друг от друга, поскольку разрушаются плотные контакты.
- Д. Щелевыми контактами элементы цитоскелета клеток связаны между собой или с внеклеточным матриксом.
- Е. Десмосома так же соотносится с полудесмосомой, как адгезионный пояс с фокальным контактом.
- Ж. Проницаемость щелевых контактов регулируется внеклеточным Ca^{2+} и рН.

14-3 Рассмотрите три мономера белка на рис. 14-1. По расположению доменов комплементарного связывания, которые изображены в виде выступов и выемок, определите, из каких мономеров может образоваться цепочка плотного контакта, из каких – десмосома, а из каких не получится ни то, ни другое.

14-4 Предложены две возможные структуры плотных контактов. По одной простой модели, основанной на данных электронной микроскопии с использованием метода замораживания–скалывания, каждая герметизирующая цепочка плотного контакта возникает в результате слияния участков мембран и образования в этих местах цилиндрических структур, состоящих из липидов (рис. 14-2, А). В другой модели предполагается, что каждая цепочка плотного контакта образована трансмембранными белками, внеклеточные домены которых связываются друг с другом, обеспечивая герметичное соединение между собой клеток эпителиального слоя (рис. 14-2, Б).

Сравнив липидную и белковую модели, вы придумали, как можно проверить их адекватность: взять за критерий характер диффузии липидов между апикальной и базолатеральной поверхностями. Их обеих моделей следует, что липиды цитоплазматиче-

Рис. 14-2. Модели плотного контакта (задача 14-4). А. Схематическое изображение, молекулярное строение и объемное изображение цилиндра из липидов, образующего плотный контакт согласно липидной модели. Б. Схематическое изображение структуры плотного контакта согласно белковой модели.

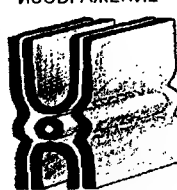
А. ЛИПИДНАЯ МОДЕЛЬ СХЕМА



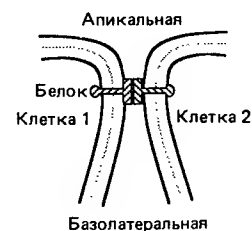
ВИД В ПОПЕРЕЧНОМ СЕЧЕНИИ



ОБЪЕМНОЕ ИЗОБРАЖЕНИЕ



Б. БЕЛКОВАЯ МОДЕЛЬ



ческой половины мембранного бислоя могут свободно диффундировать между апикальной и базолатеральной поверхностями. Однако две модели по-разному предсказывают судьбу липидов в наружном монослое мембраны. По липидной модели в наружном монослое липиды будут находиться либо в апикальной, либо в базолатеральной области, поскольку наружный монослой прерван липидной цилиндрической структурой, которая препятствует диффузии. Напротив, в белковой модели апикальная и базолатеральная поверхности соединены непрерывным наружным монослоем, т.е. по этой модели липиды могут свободно диффундировать в нем между обеими поверхностями.

У вас как раз есть экспериментальные средства для разрешения этого спорного вопроса! Вы только что работали с линией клеток почки собаки, которые образуют чрезвычайно плотный эпителий с хорошо различимыми апикальной и базолатеральной поверхностями. Кроме того, эти клетки после заражения вирусом гриппа вырабатывают белок, способствующий слиянию только на апикальной поверхности. Это дает вам возможность очень эффективно сливать липосомы только с апикальной поверхностью инфицированных клеток путем их короткой экспозиции при низком pH (условия активизации белка слияния). Таким образом, добавив флуоресцентно меченные липиды на апикальную поверхность вы сможете с помощью флуоресцентного микроскопа определить их миграцию на базолатеральную поверхность.

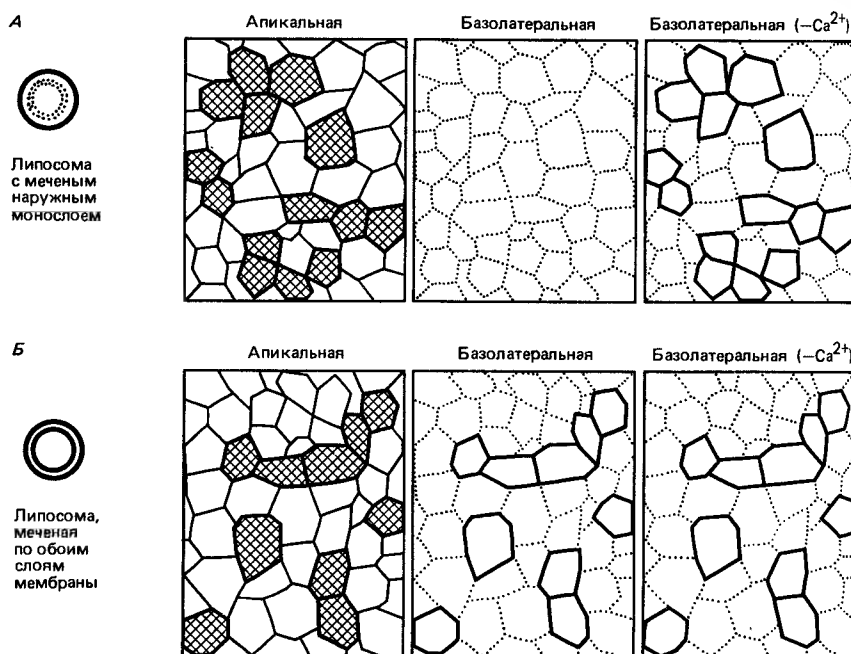
Вы готовите для опыта два набора меченых липосом: у одних меченый липид находится только в наружном монослое мембраны, у других он равномерно распределен между внутренним и наружным монослоями. Вы проводите слияние липосом двух типов с эпителием, в котором примерно половина клеток инфицирована вирусом. Меняя глубину резкости микроскопа, вы определяете флуоресценцию в апикальной и в базолатеральной поверхностях. Контролем служит вариант со средой без кальция (условия разрушения плотных контактов). Результаты опыта представлены на рис. 14-3.

Вы в восторге! Эти результаты ясно показывают, что в наружном монослое меченые липиды находятся только на апикальной поверхности, тогда как в цитоплазматической половине бислоя они свободно диффундируют между апикальной и базолатеральной поверхностями. Торжествуя, вы показываете эти результаты своему руководителю как доказательство того, что верна липидная модель плотного контакта. Он тщательно исследует ваши результаты, качает головой, демонстрируя свою проницательность, и говорит, что опыты проведены блестяще, но, несмотря на это, вы сделали заключение, как раз противоположное правильному. Полученные результаты на самом деле показывают, что липидная модель неверна.

Что руководитель увидел в ваших данных, а вы проглядели? Каким образом ваши результаты опровергают липидную модель? Если верна белковая модель, то почему меченые липиды находятся только на апикальной поверхности?

- 14-5** Перенос зарядов в эпителии, связанный с движением малых ионов, должен происходить в основном через щели между клетками, поскольку клеточная мембрана является хорошим электрическим изолятором. Таким образом, электрическое сопротивление эпителия зависит от герметизирующих свойств плотных контактов (рис. 14-4).

Рис. 14-3. Экспериментальная проверка липидной и белковой моделей плотного контакта (задача 14-4). *А.* Липосомы, меченые по наружному монослою мембраны. *Б.* Липосомы, меченые по обоим монослоям. В каждом опыте примерно половина клеток инфицирована вирусом. Только инфицированные клетки способны к слиянию с мечеными липосомами в условиях проведения опыта.



Некоторое время назад вы со своим руководителем обнаружили, что существует корреляция между электрическим сопротивлением эпителия и количеством герметизирующих цепочек в плотном контакте. Такую зависимость можно объяснить двумя путями. Если каждая герметизирующая цепочка обладает определенным сопротивлением, то общее сопротивление плотного контакта будет линейно зависеть от числа герметизирующих цепочек (как при последовательном соединении электрических сопротивлений). С другой стороны, можно предположить, что каждая герметизирующая цепочка находится в одном из двух состояний: закрытом

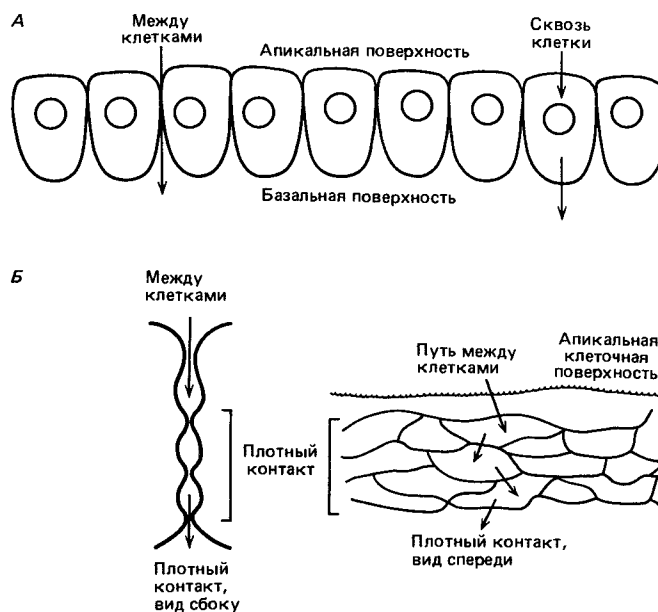


Рис. 14-4. Вид эпителия сбоку (*А*) и изображение в двух проекциях плотных контактов, связывающих клетки в эпителии, (*Б*) (задача 14-5).

(с высоким сопротивлением) или открытым (с низким сопротивлением). Тогда сопротивление плотного контакта должно зависеть от вероятности такого состояния, когда цепочки по данной траектории через плотный контакт открыты одновременно. В этом случае общее сопротивление будет логарифмической функцией числа герметизирующих цепочек.

Чтобы иметь количественные данные для выбора между этими двумя возможностями, вы измеряете сопротивление эпителия четырех разных типов из тканей кролика: высокопроницаемого эпителия из проксимального почечного канальца, менее проницаемого эпителия желчного пузыря, практически непроницаемого эпителия дистального почечного канальца и совсем непроницаемого эпителия мочевого пузыря. Кроме того, вы получаете с помощью метода замораживания-скальвания электронные фотомикрографии, на которых определяете среднее число герметизирующих цепочек в плотных контактах, окружающих каждую клетку в этих эпителиях. Полученные результаты представлены в табл. 14-1. Какое из двух предложенных объяснений корреляции между электрическим сопротивлением эпителия и числом герметизирующих цепочек в плотном контакте подтверждается результатами ваших опытов?

Таблица 14-1. Корреляция между электрическим сопротивлением и числом цепочек в плотных контактах из разных эпителиев (задача 14-5)

Эпителий	Среднее число цепочек в плотном контакте	Удельное сопротивление плотного контакта
Проксимальный почечный каналец кролика	1,2	$1,2 \cdot 10^4$
Желчный пузырь кролика	3,3	$5,6 \cdot 10^4$
Дистальный почечный каналец кролика	5,3	$6,2 \cdot 10^5$
Мочевой пузырь кролика	8,0	$5,6 \cdot 10^6$

14-6 При подходящих условиях культивирования клетки сердца мыши сокращаются с характерной частотой, которая может возрасти при добавлении циклического АМР или ингибиторов его гидролиза. Добавление норадреналина приводит к увеличению частоты сокращений за счет повышения внутриклеточного уровня сАМР.

Культивируемые клетки яичника крысы реагируют на фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) увеличением синтеза активатора протеазы, называемого тканевым активатором плазминогена (ТАП). Этот ответ также осуществляется посредством увеличения внутриклеточного уровня циклического АМР.

ФСГ не оказывает влияния на сокращение сердечных клеток, а норадреналин — на синтез ТАП в клетках яичника. Однако, когда клетки этих двух типов смешивают и культивируют совместно, добавление ФСГ или норадреналина приводит к увеличению как частоты сокращений сердечных клеток, так и синтеза ТАП в клетках яичника. Добавление в среду фермента, гидролизующего циклический АМР до 5'-АМР, не влияет на это «сотрудничество».

Предложите объяснение этих результатов. Как вы могли бы проверить свою гипотезу?

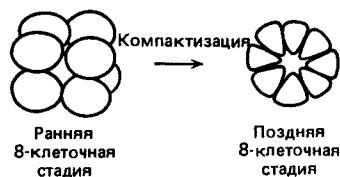


Рис. 14-5. Компактизация 8-клеточного зародыша мыши (задача 14-7).

14-7 Оплодотворенные яйца мышей вначале делятся очень медленно. Две клетки образуются примерно через 24 ч, а 8 клеток – через 48 ч. На 8-клеточной стадии происходит процесс, называемый компактизацией (рис. 14-5). Механизм его неясен, но, по-видимому, клетки теснее смыкаются друг с другом, и в результате скопление рыхло расположенных клеток превращается в плотный шарик. Вы хотите узнать, какие межклеточные контакты существуют до и после этого изменения в характере адгезии.

Чтобы получить ответ на этот вопрос, вы используете очень тонкие стеклянные микропипетки в качестве микроэлектродов и одновременно для микроинъекций фермента пероксидазы хрена (ПХ) с мол. массой 40 000 Да либо флуоресцентного красителя флуоресцеина с мол. массой 330 Да. Флуоресцеин дает при УФ-освещении ярко-желтую флуоресценцию; ПХ определяют путем фиксации клеток и инкубации их с соответствующими субстратами.

Вы вводите в зародыш на разных стадиях развития эти два маркера. Как для 2-, так и для 8-клеточной стадий получаются разные результаты в зависимости от того, проводится ли инъекция сразу после деления клеток или позже (рис. 14-6); частично это различие можно отнести за счет влияния цитоплазматических мостиков, сохраняющихся в течение некоторого времени, пока цитокinesis полностью не завершится.

- А. Почему и ПХ, и флуоресцеин на ранней 2-клеточной стадии проходят между смежными клетками, а позже – нет?
- Б. Почему в компактизованном 8-клеточном зародыше флуоресцеин проходит во все клетки, а ПХ остается в инъецированной клетке?
- В. На какой из четырех стадий развития, показанных на рис. 14-6, можно обнаружить электрическое сопряжение, если подавать ток с электрода, используемого для введения пероксидазы, а регистрировать импульс на электроде, служащем для введения флуоресцеина?

14-8 Рассмотрите электронные фотомикрографии на рис. 14-7. Определите на каждой из них тип контакта.

Внеклеточный матрикс (МБК 14.2)

Рис. 14-6. Микроинъекция ПХ и флуоресцеина в 2- и 8-клеточные зародыши мыши (задача 14-7).

14-9 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. Сеть из связанных между собой белковых и полисахаридных молекул, примыкающая к внешней поверхности большинства

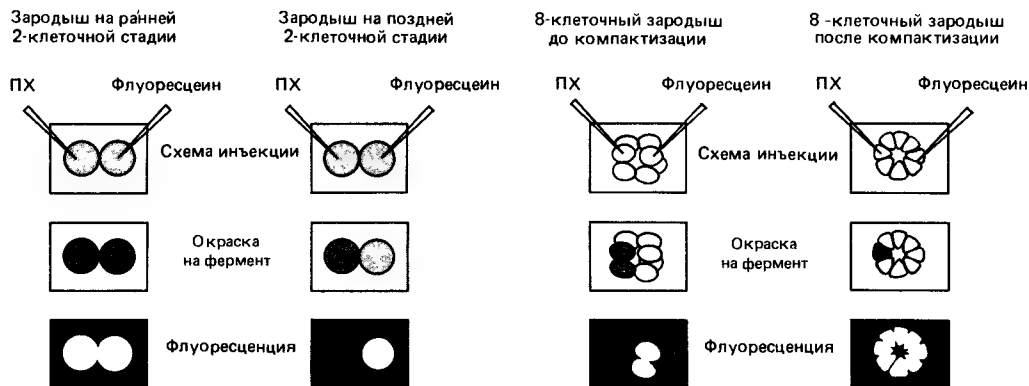
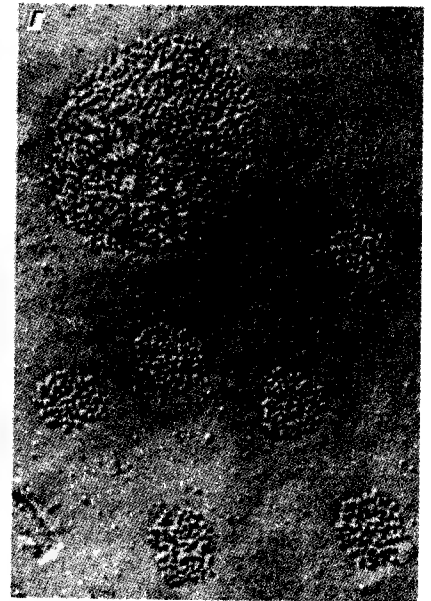
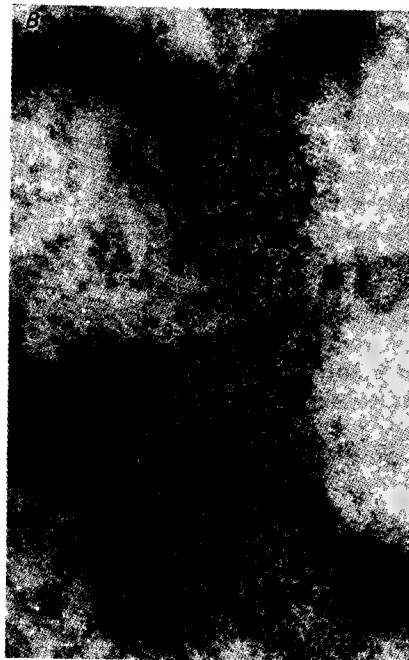


Рис. 14-7. Электронные фотомикрографии различных клеточных контактов (задача 14-8). (С любезного разрешения Н. Лейн.)



- клеток в многоклеточных организмах, называется _____ .
- Б. Кожа и кость состоят в основном из _____ – название, которое часто используется для обозначения внеклеточного матрикса вместе с заключенными в нем клетками.
- В. _____ представляют собой длинные неразветвленные полисахаридные цепи, составленные из повторяющихся дисахаридных единиц, в которых обязательно содержится аминсахар.
- Г. _____ это полисахарид, содержащийся в большом количестве во внеклеточном матриксе эмбрионов животных; от других гликозаминогликанов его отличают крупные размеры, отсутствие сульфатных групп и простая структура – он построен из повторяющихся дисахаридных звеньев.
- Д. _____ синтезируются в основном так же, как гликопротеи-

ны, однако у них полисахаридные цепочки присоединены к остаткам серина, и молекулярная масса углевода может превышать массу сердцевинного белка в 10–20 раз.

- Е. _____ – это наиболее распространенные белки у млекопитающих; их отличительными чертами являются трехцепочечная спиральная структура и высокое содержание глицина и пролина.
- Ж. Основной компонент эластических волокон – _____; это очень гидрофобный негликозилированный белок, содержащий мало гидроксипролина и гидроксисилина.
- З. Из всех внеклеточных адгезионных гликопротеинов лучше всего изучен _____, который способствует адгезии клеток к субстрату, связываясь с рецепторами клеточной поверхности и с различными компонентами внеклеточного матрикса.
- И. Непрерывный тонкий слой специализированного внеклеточного матрикса, подстилающий все эпителиальные слои и трубочки и окружающий отдельные мышечные и жировые клетки, называется _____.
- К. _____ – гликопротеин, состоящий из трех крестообразно расположенных полипептидов, – связывается с коллагеном типа IV, гепарансульфатом и клеточными поверхностями.
- 14-10** Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие – нет. Если утверждение неверно, объясните почему.
- А. Внеклеточный матрикс представляет собой относительно инертный наполнитель, стабилизирующий структуру тканей.
 - Б. Главное химическое различие между гликопротеинами и протеогликанами относится к структуре их углеводных боковых цепей: в гликопротеинах это короткие, сильно разветвленные олигосахариды, а в протеогликанах – намного более длинные неразветвленные полисахаридные цепи.
 - В. Протеогликаны базальной мембраны почечных клубочков играют решающую роль в регуляции поступления макромолекул из крови в мочу.
 - Г. Разрушение и ресинтез коллагена очень важны для поддержания внеклеточного матрикса; в противном случае отсутствие витамина С не приводило бы к цинге, при которой из-за недостаточного гидроксирования коллагена происходит прогрессирующее ослабление соединительной ткани.
 - Д. При созревании фибриллярных коллагенов разрушаются по три пептидные связи в каждом полипептидном мономере.
 - Е. Когда цитохалазин разрушает актиновые микрофиламенты фибробластов, клетки теряют контакт с волокнами фибронектина в субстрате, что указывает на непосредственную связь между фибронектином и актином.
 - Ж. Коллагены большинства типов образуют фибриллы, а молекулы коллагена типа IV вместо этого формируют сеть наподобие пласта, составляющую основу базальной мембраны.
 - З. Упругие свойства эластина обусловлены высоким содержанием в нем альфа-спиралей, которые действуют как молекулярные пружины.
 - И. Клетки никогда не связываются с молекулами внеклеточного матрикса непосредственно, а всегда опосредованно, через внеклеточные гликопротеины.

- 14-11** Эмбриональные слюнные железы у мышей образуются из эпителия. В процессе морфогенеза закладка слюнной железы разветвляется, в результате чего образуются протоки и доли, из

Рис. 14-8. Развитие слюнных желез мыши в культуре клеток (задача 14-11).

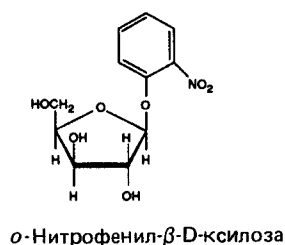
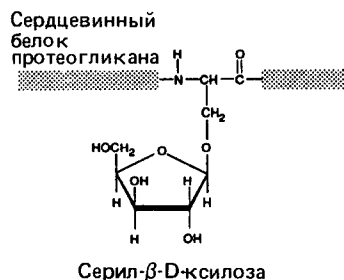
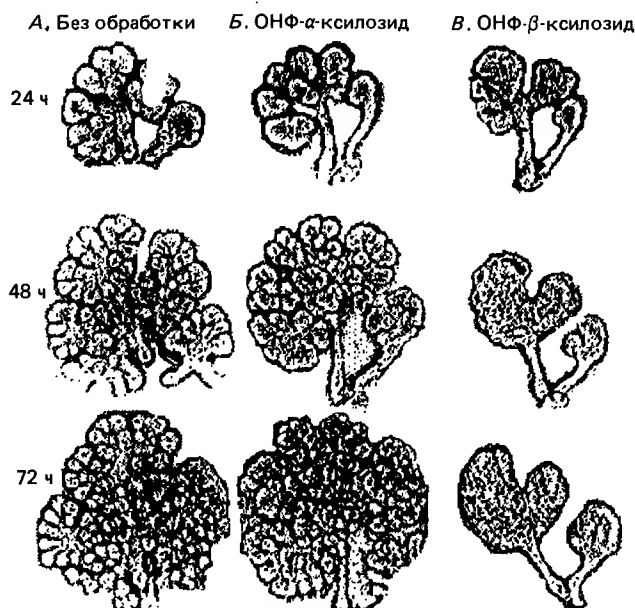


Рис. 14-9. Структура связи белок ксилоза, ОНФ-β-D-ксилозида и ОНФ-α-D-ксилозида (задача 14-11).

которых состоит сформированная железа. В культуре слюнные железы проходят почти такое же развитие, как и в организме, образуя, как правило, через три дня в 7 или 10 раз больше долей, чем их имеется к концу первого дня (рис. 14-8). Такой процесс образования долей носит название ветвления.

Решающее значение для морфогенеза по типу ветвления имеет базальная мембрана. Ингибиторы синтеза одного из главных ее компонентов — коллагена, например аналог пролина азетидин-2-карбоксилатная кислота, подавляют ветвление. Другим главным компонентом базальной мембраны является протеогликан. Что произойдет, если заблокировать его синтез? Гликозаминогликаны синтезируются путем последовательного добавления по одной единице сахара к сердцевинному белку, начиная с нетипичного остатка в полипептидном остове (рис. 14-9). Аналог ксилозы o-нитрофенил-β-D-ксилозид (ОНФ-β-D-ксилозид, рис. 14-9) в аппарате Гольджи конкурирует с гликозаминогликаном за присоединение к белку. Если такой аналог добавить к развивающимся слюнным железам, то железы будут расти, но в них не будут образовываться доли, т.е. не будет ветвления (рис. 14-8). Обработка ОНФ-α-D-ксилозидом не оказывает влияния на развитие железы (рис. 14-8). Это показывает, что эффект специфичен для природного изомера и что ингибирование не связано с неспецифической токсичностью.

Чтобы определить, как ОНФ-β-D-ксилозид действует на синтез протеогликана, измеряли включение $^{35}\text{SO}_4$ в синтезирующиеся гликозаминогликаны в разных условиях, как представлено в табл. 14-2. Весь $^{35}\text{SO}_4$ включался в гликозаминогликаны, что подтверждалось их чувствительностью к расщеплению гиалуронидазой.

- Почему в отсутствие ОНФ-β-D-ксилозида циклогексими́д подавляет включение $^{35}\text{SO}_4$, а в его присутствии — нет?
- Почему в среде обнаружено такое большое количество материала, меченного $^{35}\text{SO}_4$, когда применяли ОНФ-β-D-ксилозид?
- Почему ОНФ-β-D-ксилозид приводит к таким существенным

Таблица 14-2. Действие ксилозидов на синтез гликозаминогликанов (включение $^{35}\text{SO}_4$ клетками культивируемой слюнной железы) (задача 14-11)

Воздействие на клетки	Имп/мин		
	В ткани	В среде	Суммарно
Контроль	1000	300	1300
ОНФ- α -D-ксилозид	1000	300	1300
ОНФ- β -D-ксилозид	200	3000	3200
Циклогексимид	Н.О. *	Н.О.	200
Циклогексимид + ОНФ- α -D-ксилозид	Н.О.	Н.О.	200
Циклогексимид + ОНФ- β -D-ксилозид	Н.О.	Н.О.	3000

* Н.О. не определяли

изменениям в характере включения $^{35}\text{SO}_4$, а ОНФ- α -D-ксилозид – нет?

Г. Каким образом может ОНФ- β -D-ксилозид подавлять ветвление при морфогенезе слюнных желез в тканевой культуре?

14-12 Дефекты в генах, кодирующих коллаген, служат причиной ряда наследственных заболеваний. Например, болезнь несовершенный остеогенез, при которой возникает хрупкость костей, может быть результатом дефекта в гене, кодирующем $\alpha 1$ -цепь коллагена типа I. Подобно этому синдром Элерса-Данлоса, который может приводить к внезапной смерти из-за разрыва внутренних органов или кровеносных сосудов, может быть результатом дефекта в гене, кодирующем $\alpha 1$ -цепь коллагена типа III.

При обоих заболеваниях медицинские проблемы возникают из-за того, что дефект в гене приводит к тому или иному нарушению функции коллагеновых волокон. Например, при гомозиготности по делециям гена $\alpha 1$ -цепи коллагена типа I эти цепи полностью элиминируются и, следовательно, не могут образоваться фибриллы коллагена типа I. Такая гомозиготность по мутации обычно приводит к летальному исходу в раннем периоде развития. Более распространенный случай – гетерозиготность по мутантному гену, когда присутствуют один нормальный и один мутантный ген. Последствия при этом менее тяжелые.

- А. Рассчитайте долю молекул коллагена типа I, $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$, которая будет нормальной, для человека, гетерозиготного по делеции всего $\alpha 1(I)$ -гена. Повторите расчет для гетерозиготы по точковой мутации $\alpha 1(I)$ -гена.
- Б. Рассчитайте долю молекул коллагена типа III, $[\alpha 1(III)]_3$, которая будет нормальной для индивида, гетерозиготного по делеции всего $\alpha 1(III)$ -гена. Повторите расчет для гетерозиготы до точковой мутации $\alpha 1(III)$ -гена.
- В. Дефект какого типа в гене коллагена, делеция или точковая мутация, с большей вероятностью является доминантным (т.е. приводит к проявлению мутантного фенотипа у гетерозиготы)?

14-13 Формирование зрелой молекулы коллагена – это сложный процесс. Сначала из трех коллагеновых цепей, имеющих дополнительные участки на N- и C-концах, образуется проколлаген. Если

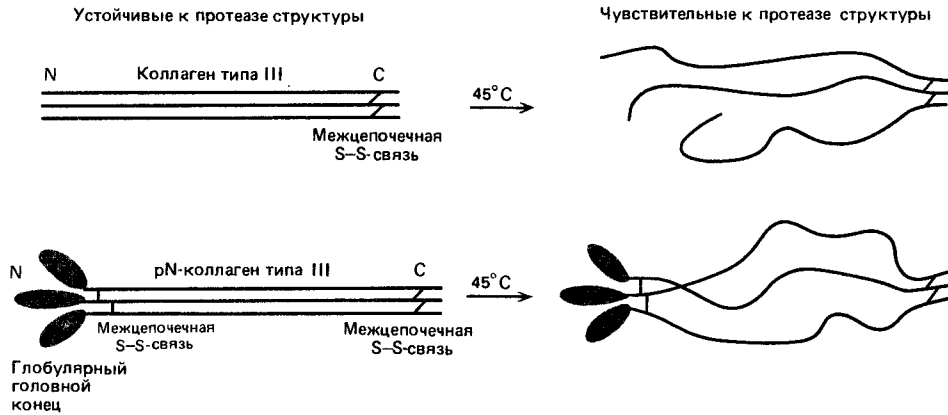


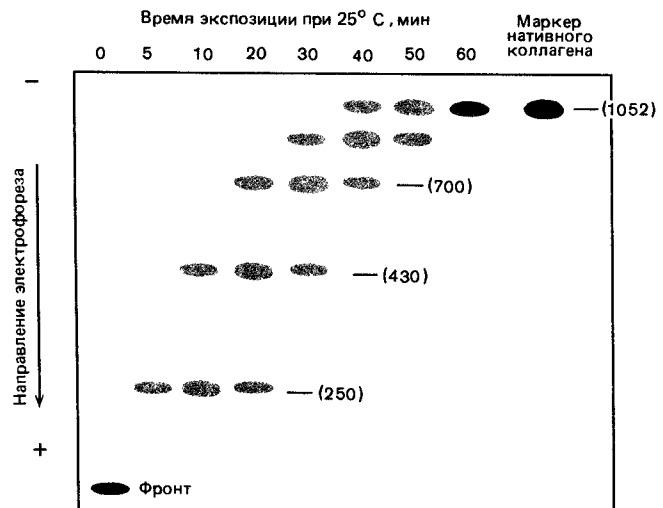
Рис. 14-10. Нативная и денатурированная формы коллагена типа III и рN-коллагена типа III (задача 14-13).

цепи правильно переплетутся друг с другом, концевые пептиды отщепляются. Основная функция концевых пропептидов, по-видимому, заключается в правильном расположении цепей для облегчения их сборки.

Процесс сборки коллагена изучали с использованием двух форм коллагена типа III: зрелого коллагена типа III и его предшественника с еще сохраняющимися N-концевыми пропептидами рN-коллагена типа III (рис. 14-10). В обеих формах коллагена индивидуальные цепи удерживались вместе дисульфидными связями. Эти связи удерживают цепи в определенном порядке, так что если даже последние полностью расплетутся, то молекулы коллагена вновь соберутся правильно (рис. 14-10).

Повторную сборку таких двух форм коллагена изучали после их денатурации при 45°C в условиях, при которых дисульфидные связи оставались интактными. Затем температуру снижали до 25°C, создавая условия для восстановления коллагенов, и периодически отбирали пробы в течение 60 мин. Каждую пробу сразу же обрабатывали трипсином, который быстро расщепляет денатурированные цепи, но не затрагивает цепи в спиральной молекуле коллагена. Затем пробы исследовали с помощью двумерного электрофореза в присутствии 2-меркаптоэтанола, который разрушает дисульфидные связи. Оба коллагена дали одинаковые полосы в геле (рис. 14-11). Обращает на себя внимание то,

Рис. 14-11. Анализ повторной сборки коллагена типа III и рN-коллагена типа III (задача 14-13). После разных по длительности периодов инкубации при 25°C образцы обрабатывали трипсином, а затем подвергали электрофорезу. Затемненные области соответствуют положениям устойчивых к трипсину пептидов. Числа в скобках показывают примерное число аминокислотных остатков в составе устойчивых к трипсину пептидов.



что, если дисульфидные связи оставались интактными во время электрофореза, все полосы сменялись полосами с трехкратно увеличенной мол. массой.

- А. Почему все устойчивые к трипсину пептиды увеличиваются в три раза по мол. массе, если дисульфидные связи остаются интактными?
- Б. Какие дисульфидные связи в рN-коллагене типа III (N-концевые или C-концевые) ответственны за увеличение мол. массы этих устойчивых пептидов?
- В. Как начинается сборка таких коллагеновых молекул: по специфическим или по случайным участкам? Если по специфическим, то укажите эти участки.
- Г. Происходит ли сборка с помощью механизма типа застежки-молнии или в ее основе лежит принцип «все или ничего»? Как это определить на основе приведенных результатов?

14-14 Фибронектин – это крупный гликопротеиновый компонент внеклеточного матрикса. В его молекуле имеется несколько связывающих доменов, расположенных вдоль полипептидной цепи; один из них служит для присоединения к рецепторам фибронектина на клеточной поверхности.

Фибронектин способен прикреплять клетки к поверхностям, на которых другим способом они не могли бы закрепиться. На этом основан простой способ изучения той части его молекулы, которую узнает рецептор фибронектина. Фибронектин наносят на поверхность пластиковых чашек. Затем в них помещают суспензию клеток и проводят инкубацию в течение 30 мин, после чего чашки отмывают и подсчитывают число прикрепившихся клеток. В отсутствие фибронектина клетки не прикрепляются, а в его присутствии прикрепляется 80–90% клеток. Другие белки, например сывороточный альбумин, прикрепляются к пластику, но не способствуют прикреплению клеток.

С помощью такого метода можно анализировать очень мелкие фрагменты фибронектина при условии, что они химически соединены с крупными молекулами, например с альбумином, обеспечивающими прикрепление к пластиковым чашкам. Получая фрагменты фибронектина, можно идентифицировать домен, связывающийся с клеткой, например сегмент из 108 аминокислотных остатков, составляющий три четверти длины всей цепи от N-конца.

Для точной локализации активного участка с помощью метода связывания клеток были проверены синтетические пептиды, соответствующие различным участкам сегмента из 108 аминокислотных остатков. Были поставлены эксперименты двух типов. В одних пептиды ковалентно связывались через цистеиновый остаток с белком, покрывающим пластик, после чего их проверяли на способность вызывать прикрепление клеток. Полученные результаты представлены в табл. 14-3. В других опытах пластиковые чашки покрывали нативным фибронектином и клетки инкубировали в чашках в течение 30 мин в присутствии синтетических пептидов, указанных в табл. 14-4. Затем чашки отмывали и подсчитывали число прикрепившихся клеток.

- А. В экспериментах двух типов использованы разные подходы к определению присоединяющегося к клеткам фрагмента фибронектина. Одинаковы ли способы прикрепления клеток к чашке в двух вариантах опытов? Объясните разницу между вариантами.

Таблица 14-3. Тестирование фибронектин-подобных пептидов на способность вызывать прикрепление клеток (задача 14-14)

Пептид	Последовательность	Концентрация, необходимая для прикрепления 50% клеток, нмоль/мл
Фибронектин		0,10
Пептид 1	YAVTGRGDSPASSKPI SINYRTEIDKPSQM(C)*	0,25
Пептид 2	VTGRGDSPASSKPI(C)	1,6
Пептид 3	SINYRTEIDKPSQM(C)	> 100
Пептид 4	VTGRGDSPA(C)	2,5
Пептид 5	SPASSKPI(C)	> 100
Пептид 6	VTGRGD(C)	10
Пептид 7	GRGDS(C)	3,0
Пептид 8	RGDSPA(C)	6,0
Пептид 9	RVDSPA(C)	> 100

* (C) на С-конце указывает на связь с белком-носителем через цистеин.

Таблица 14-4. Тестирование фибронектин-подобных пептидов на способность блокировать прикрепление клеток (задача 14-14)

Пептид	Процент прикрепившихся клеток
GRGDSPC	2,0
GRGDAPC	1,9
GKGDSPC	48
GRADSPC	49
GRGESPC	44
Отсутствует	47

Б. По результатам, приведенным в таблицах, определите, какая аминокислотная последовательность фибронектина узнается клетками.

В. Как можно использовать эти результаты для создания метода выделения рецептора фибронектина?

14-15 Один из способов получения мутаций у мышей состоит в том, что зародышей инфицируют ретровирусами, которые встраиваются в геном случайным образом. Если ретровирус включается в клетку, которая станет частью зародышевой линии, то он сохраняется в последующих поколениях. Используя этот метод, вы получили чрезвычайно интересную линию, в которой ретровирус, по-видимому, встроился в ген, имеющий решающее значение для раннего эмбрионального развития (рис. 14-12, А). Важная роль этого гена выявляется в опытах по скрещиванию брат × сестра между гетерозиготами по ретровирусной вставке с последующим анализом ДНК от 12-дневных зародышей. Используя зонд, расположенный непосредственно около сайта встраивания, вы обнаруживаете три явно различающихся набора фрагментов гибридизации (рис. 14-12, Б): набор 1 характерен для гомозигот

Рис. 14-12. Анализ ДНК зародышей, полученных от скрещивания «брат × сестра» (задача 14-15).

А. Соотношение между нормальным геном и геном с ретровирусной вставкой. Б. Радиоавтограф, полученный после расщепления ДНК рестриктазой (R), которая не действует на ретровирус, и последующего разделения фрагментов в геле. ДНК переносили на нитроцеллюлозный фильтр, гибридизовали с радиоактивным зондом, который соответствовал клеточным последовательностям, расположенным непосредственно вблизи сайта встраивания, и подвергали радиоавтографии.

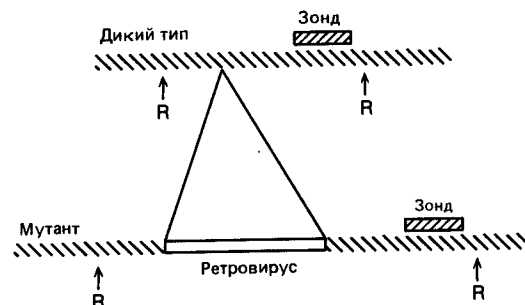
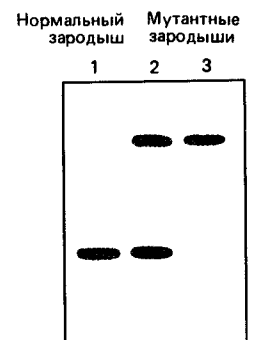
А. СТРУКТУРА ГЕНОВ**Б. АНАЛИЗ В ГЕЛЕ**



Рис. 14-13. Анализ мРНК контрольных (к) и мутантных (м) зародышей (задача 14-15). РНК выделена из нормальных и мутантных гомозиготных зародышей, разделена в геле и подвергнута гибридизации с радиоактивно меченной ДНК исследуемого гена и клонов гена коллагена. Числа указывают размеры мРНК в т. п. н. На нескольких дорожках видны две полосы гибридизованной РНК; для некоторых генов эукариотических клеток характерно образование множественных форм мРНК.

по нормальному гену, набор 2 – для гетерозигот, а набор 3 – для гомозигот по мутантному гену.

Набор 3 выявляется примерно у четвертой части 12-дневных зародышей, но вы никогда не находите его у новорожденных. Выясняется также, что примерно на 14-й день такие зародыши погибают, по-видимому, из-за обильного кровотечения из крупных кровеносных сосудов. Во всех остальных отношениях основные ткани и типы клеток кажутся нормальными. Из этого следует, что у гомозигот мутантный ген вызывает нарушение на определенной стадии развития.

При последующей работе вы обнаруживаете, что мРНК, соответствующая поврежденному гену, вырабатывается только фибробластами, миобластами и хондроцитами. Кроме того, вы устанавливаете, что эта мРНК появляется в заметных количествах на 12-й день и затем ее уровень существенно повышается по мере развития. Все эти факты – уровень экспрессии, типы участвующих в этом клеток и разрыв кровеносных сосудов – заставляют вас заподозрить, что дефектный ген кодирует коллаген или какой-то другой компонент внеклеточного матрикса. В соответствии с этим вы берете у других исследователей несколько клонов гена коллагена и используете их для анализа мРНК от 12-дневных нормальных и гомозиготных мутантных зародышей (см. рис. 14-13).

- А. Какой ген оказался дефектным из-за встраивания ретровируса? Не удивляет ли вас результат идентификации гена в связи с тем, что у зародышей мышей явно повреждены кровеносные сосуды?
- Б. Какая часть 12-дневных зародышей, полученных при скрещивании гетерозигот брат × сестра, даст наборы 1, 2 и 3, приведенные на рис. 14-12? Какая часть новорожденных мышей даст такие наборы?
- В. Если вы хорошо знакомы с технологией рекомбинантной ДНК, попытайтесь ответить на следующий вопрос. Одно из явных преимуществ использования ретровирусных вставок заключается в том, что повреждаемый при этом ген можно легко клонировать, используя последовательности ретровирусной ДНК в качестве «этикетки». Опишите вкратце, как можно таким способом использовать ретровирус для клонирования нормального, неповрежденного гена.

Межклеточное узнавание и адгезия (МБК 14.3)

14-16 Заполните пропуски в следующих утверждениях.

- А. *Dictyostelium discoideum* – это хорошо известный представитель класса организмов, называемых _____.
- Б. Явление, когда клетки чувствуют какое-либо вещество в окружающей среде и движутся по его концентрационному градиенту, называется _____.
- В. Голодающие клетки *Dictyostelium* выделяют _____ (соединение, относящееся к классу лектинов), способствующий движению миксамеб к центрам агрегации; его действие подобно действию фибронектина, вызывающего миграцию клеток у позвоночных.
- Г. В течение первых 8 ч голодания миксамеб *Dictyostelium* их агрегация происходит посредством Ca^{2+} -зависимого механизма, в котором участвует _____; спустя 8 ч после начала голодания вступает в действие Ca^{2+} -независимый механизм агрегации клеток, в котором участвует _____.

- Д. Если клетки слипаются друг с другом при участии молекул только одного типа, то говорят, что адгезия происходит посредством _____ связывания; если клетки слипаются друг с другом за счет взаимодействия молекул разных типов, то говорят, что адгезия происходит посредством _____ связывания.
- Е. _____ и _____ — это гликопротеины плазматической мембраны, которые осуществляют адгезию между нервными клетками и между клетками печени соответственно.
- Ж. Антитела к _____, называемому также L-CAM или уворулином, препятствуют компактизации зародышей мышей на стадии дробления.
- 14-17** Укажите, какие из следующих утверждений правильные, а какие — нет. Если утверждение неверно, объясните почему.
- А. «Если бы клетки разных типов потеряли сцепление друг с другом и с внеклеточным матриксом, наши тела мгновенно распались бы и растеклись по земле потоком из смеси клеток.» — Warren Lewis, 1922. (Цит. по J. P. Trinkaus, *Cells into Organs*, 2nd ed., Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall, Inc., 1984.)
 - Б. Ткани образуются из специализированных клеток либо путем роста и деления клеток-основательниц, потомство которых остается вместе, либо в результате направленной миграции клеток, прекращающих двигаться после узнавания специфических участков-мишеней.
 - В. Самосортировка клеток по типам, наблюдающаяся при смешивании диссоциированных клеток из двух разных органов, имитирует процессы, происходящие при развитии большинства тканей.
 - Г. Антитела к Е-кадгерину блокируют как адгезию эпителиальных клеток, так и компактизацию бластомеров на ранней стадии развития зародышей мышей.
 - Д. Одна из трудностей при изучении механизмов клеточной адгезии связана с тем, что антитела почти к любым компонентам клеточной поверхности будут блокировать адгезию клеток.
 - Е. Рецепторы клеточной поверхности, ответственные за связывание клеток друг с другом и с внеклеточным матриксом, имеют значительно более низкое сродство к своим лигандам, чем большинство рецепторов гормонов.
 - Ж. Мигрирующие эмбриональные клетки не образуют специализированных контактов.
 - З. До тех пор, пока у клетки нет контакта с другой клеткой, молекулы, ответственные за клеточную адгезию, распределены по всей поверхности клетки. После установления контакта они концентрируются в определенных участках.

14-18 Не у всех слизевиков циклический АМР служит сигнальным фактором агрегации. Вы как раз обнаружили в компостной куче вашего сада виды, индифферентные к сАМР, хотя и образующие при голодании тесные агрегаты. Поскольку обычный химический сигнал неэффективен, вы задаетесь вопросом, не может ли здесь действовать механизм, отличный от химической сигнализации.

Для исследования природы сигнала вы повторяете некоторые из классических работ, выполненных на *Dictyostelium*, и обнаруживаете, что миксамебы, помещенные в каплю воды на покровном стекле, агрегируют при условии, что в ней содержатся простейшие соли. Если формирующийся центр агрегации с помощью пипетки перенести в свежеприготовленный препарат,

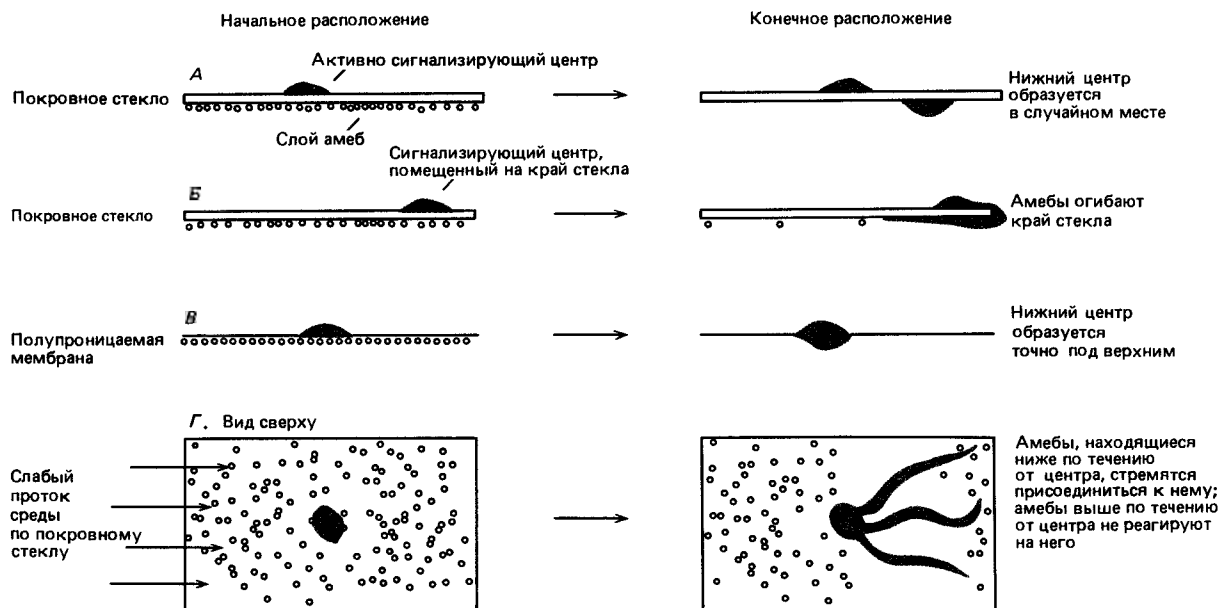


Рис. 14-14. Четыре опыта по изучению природы привлекающего сигнала, исходящего из центров агрегации (задача 14-18).

миксамебы немедленно устремляются к нему. Таким образом, центр испускает какой-то привлекающий сигнал.

Тогда вы ставите четыре опыта, используя существующий центр агрегации в качестве источника сигнала, а не экспонированных предварительно миксамеб — в качестве клеток-мишеней. Варианты расположения центров агрегации и исследуемых миксамеб в начале и конце каждого опыта приведены на рис. 14-14.

Показывают ли эти результаты, что исследуемый вид слизевиков агрегирует в ответ на химический сигнал? Как это можно определить?

14-19 Прикрепление бактериофага T4 к *E. coli* служит показательной моделью межклеточной адгезии. На этом примере хорошо видно значение множественных слабых взаимодействий, за счет которых клетки перемещаются друг относительно друга до тех пор, пока не установятся фиксированные связи. При инфицировании фагом T4 его частицы сначала прикрепляются к поверхности *E. coli* кончиками своих шести хвостовых волокон. Затем они движутся по поверхности до тех пор, пока не обнаружат подходящее место для прикрепления своей базальной пластинки. Когда базальная пластинка надежно закреплена, чехол отростка («хвоста») сокращается и фаговая ДНК впрыскивается в бактерию (рис. 14-15). Начальное взаимодействие хвостовых волокон с клеточной поверхностью является определяющим для инфекции: фаги, у которых отсутствуют хвостовые волокна, не способны инфицировать клетки.

Анализ прикрепления T4 сильно упрощается за счет того, что можно легко получать устойчивые бактерии и дефектные вирусы. Мутанты бактерий, устойчивые к инфекции T4, делятся на два класса: у одних отсутствует один из важных белков наружной поверхности мембраны, называемый *ompC* (*outer membrane protein C*); у других имеются изменения в длинной полисахаридной цепи, в норме входящей в состав бактериального липополисахарида ЛПС (липид с длинной полисахаридной цепью, присоединенной к его головной группе). Инфекционность T4 по отноше-

Рис. 14-15. Прикрепление фага Т4 (А) и инъекция его ДНК в бактерию (Б) (задача 14-19).

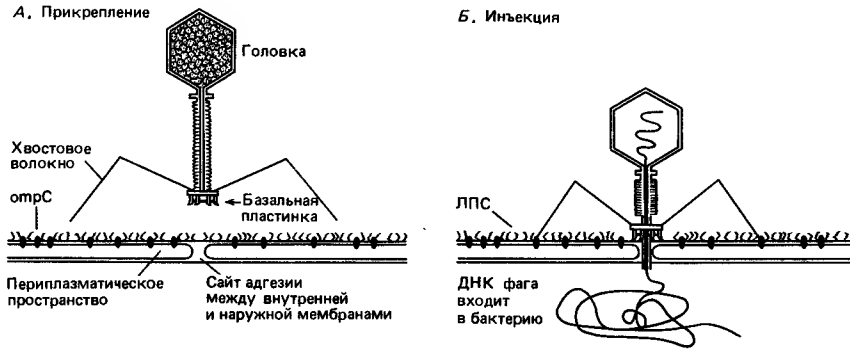


Таблица 14-5. Инфекционность фага Т4 для мутантных штаммов *E. coli* (задача 14-19)

Штамм	Относительная инфекционность фага
<i>ompC</i> ⁺ ЛПС ⁺	1
<i>ompC</i> ⁻ ЛПС ⁺	10 ⁻³
<i>ompC</i> ⁺ ЛПС ⁻	10 ⁻³
<i>ompC</i> ⁻ ЛПС ⁻	10 ⁻⁷

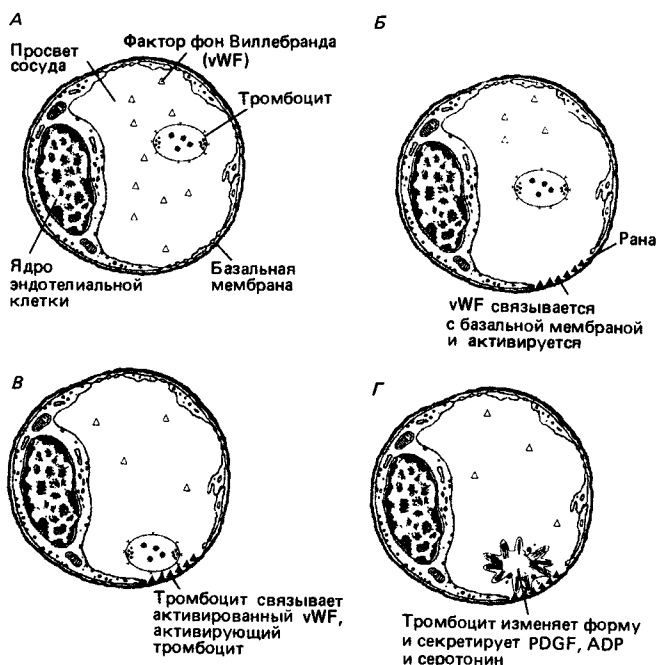
нию к мутантным клеткам и клеткам дикого типа приведена в табл. 14-5. Эти результаты означают, что каждое хвостовое волокно Т4 имеет два сайта связывания: один для ЛПС, другой для *ompC*. Электронные фотомикрографии, показывающие взаимодействие между изолированными хвостовыми волокнами и ЛПС, свидетельствуют о том, что отдельные связи не очень прочны, поскольку лишь около 50% волокон связано с ЛПС.

- А. Предположим, что в любой момент каждое из шести хвостовых волокон с вероятностью 0,5 связывается с ЛПС и с такой же вероятностью — с *ompC*. При таком допущении доля фагов на бактериальной поверхности, у которых ни одно из шести хвостовых волокон не прикреплено в данный момент времени, составляет $(0,5)^6$ (0,5 — вероятность того, что данный сайт связывания остается свободным, показатель степени — число сайтов связывания из расчета по два на каждое из шести хвостовых волокон). В свете таких рассуждений какова в популяции доля фагов, в любой данный момент времени прикрепленных по крайней мере одним хвостовым волокном? (Доля прикрепленных фагов равна единице минус доля неприкрепленных фагов.) Предположим, что у бактерий отсутствует *ompC*. Какова тогда в популяции доля фагов, прикрепленных по крайней мере одним хвостовым волокном в любой данный момент времени?
- Б. Как это ни странно, проведенное выше сравнение бактерий дикого типа и *ompC*-бактерий выявило очень незначительное различие между ними по величине фракции прикрепленных фагов в каждый момент времени. Однако, как следует из данных табл. 14-5, устойчивость к инфицированию у этих двух линий различается на три порядка. Какое объяснение вы можете предложить для разрешения этого кажущегося парадокса?

- 14-20** Кровяные пластинки (тромбоциты) представляют собой очень мелкие, лишенные ядер клетки в составе крови. Они играют решающую роль в восстановлении поврежденных кровеносных сосудов (рис. 14-16). При повреждении сосуда подстилающие коллагеновые фибриллы приходят в контакт с эндотелиальным слоем кровеносных сосудов и связывают плазматический белок, называемый фактором фон Виллебранда (vWF). После этого vWF, связанный с коллагеном, соединяется с рецептором, находящимся на поверхности кровяных пластинок. В результате связывания рецептора приходит в действие механизм слипания тромбоцитов — их форма быстро изменяется от гладкой и уплощенной до округлой с выростами, и они начинают выделять вещества, служащие хемоаттрактантами для клеток, участвующих в восстановлении поврежденной ткани.

Рис. 14-16. Роль тромбоцитов в репарации повреждения в эпителии кровеносного сосуда (задача 14-20).

А. Нормальный эпителий кровеносного сосуда. **Б.** Поврежденный эпителий, связывающий vWF. **В.** Тромбоцит, связывающий vWF. **Г.** Изменение формы тромбоцита, сопровождающееся выделением хемоаттрактантов.



Агрегация тромбоцитов может осуществляться при участии только одного типа адгезионных молекул клеточной поверхности, взаимодействующих либо непосредственно друг с другом (рис. 14-17, А), либо с соединяющими молекулами (рис. 14-17, Б). Возможно также участие в агрегации адгезионных молекул двух типов, взаимодействующих непосредственно или через соединяющую молекулу (рис. 14-17, В). Ниже перечислены факты, которые помогают решить, какой из этих четырех механизмов связывания реализуется кровяными пластинками.

1. Для агрегации кровяных пластинок необходимы фибриноген и кровяные пластинки, содержащие на поверхности рецепторы фибриногена. (Фибриноген – это белок сыворотки крови, участвующий в процессе свертывания.)
2. Больные, у которых кровяные пластинки не содержат рецепторов фибриногена, страдают серьезным нарушением свертывания крови, известным как синдром Гланцмана.
3. Агрегацию кровяных пластинок можно блокировать любым из двух пептидов, соответствующих двум разным областям молекулы фибриногена.
4. Избыток любого из указанных пептидов ингибирует связывание фибриногена лишь примерно на 50%.

- А.** Какой из четырех механизмов связывания, показанных на рис. 14-17, в наибольшей степени соответствует процессу агрегации тромбоцитов? Объясните, как каждое из экспериментальных наблюдений согласуется с выбранным вами механизмом.
- Б.** У больных с синдромом Гланцмана тромбоциты не агрегируют друг с другом при активации, вызванной повреждением ткани. На основании выбранного вами механизма связывания предскажите, будут ли такие тромбоциты агрегировать с нормальными.

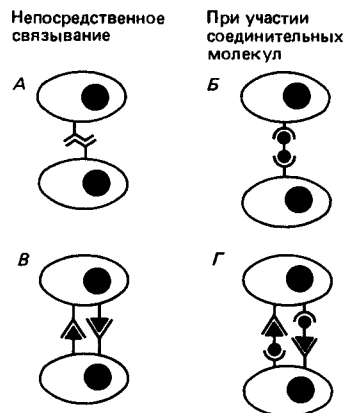


Рис. 14-17. Четыре вида межклеточных взаимодействий между однотипными клетками (задача 14-20).

- 14-21** В процессе эмбрионального развития отростки нервных клеток прикрепляются к мышечным клеткам. Взаимодействие между клетками разных типов может происходить аналогично взаимо-

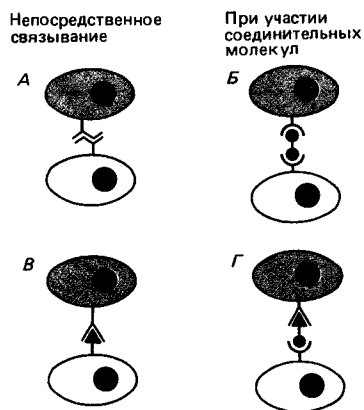


Рис. 14-18. Четыре вида взаимодействий между разнотипными клетками (задача 14-21).

действию между однотипными клетками (рис. 14-18). Чтобы исследовать механизм прикрепления, вы используете линию нервных клеток-предшественников, которые дифференцируются в нервные клетки при подходящих условиях. Вы изучаете их прикрепление к мышечным клеткам, смешивая меченые нервные клетки с обработанными коллагеназой мышечными клетками, базальная мембрана которых остается intactной. К каждой мышечной клетке прикрепляется около 50 нервных клеток. Эта адгезия весьма специфична: эмбриональные фибробласты и клетки печени, например, не проявляют никакой адгезивности к таким мышечным клеткам.

Чтобы выявить компоненты клеточной поверхности, обеспечивающие взаимодействие, вы обрабатываете нервные и мышечные клетки нейраминидазой, которая отщепляет N-ацетилнейраминную (сиаловую) кислоту от углеводного полимера, и проназой, которая расщепляет белки. Результаты представлены в табл. 14-6. Кроме того, вы обнаруживаете, что из всех испытанных сахаров только сиаловая кислота ингибирует прикрепление нервных клеток при добавлении ее в среду. Муцин, содержащий в большом количестве сиаловую кислоту, является даже более эффективным, чем мономерный сахар. Полимеры, содержащие другие кислоты (не сиаловую), такие, как гепарин, гиалуроновая кислота и хондроитинсульфат, не оказывают действия. Если мышечные клетки предварительно проинкубировать с муцином, а затем отмыть, они не будут связываться с нервными клетками. Если же обработать муцином нервные клетки, они будут прикрепляться к мышечным клеткам по-прежнему.

Таблица 14-6. Влияние обработки ферментами на прикрепление нервных клеток к мышечным (задача 14-21)

Опыт	Обработка		Результат
	Нервные клетки	Мышечные клетки	Нервные клетки/ мышечные клетки
1	Без обработки	Без обработки	58
2	Нейраминидаза	—»—	4
3	Без обработки	Нейраминидаза	56
4	Нейраминидаза	—»—	2
5	Проназа	Без обработки	55
6	Без обработки	Проназа	5

Опишите взаимодействие между нервными и мышечными клетками, насколько это позволяют сделать приведенные данные.

14-22 Другой пример взаимодействий неидентичных клеток можно наблюдать у дрожжевого организма *Hansenula wingei*. Для него характерны два типа различающихся по типу спаривания гаплоидных клеток, обозначаемые как 5 и 21. Клетки одного и того же типа спаривания не агрегируют друг с другом, а клетки разных типов спаривания агрегируют. Агрегация способствует спариванию, хотя и не является его главным условием. Чтобы определить природу межклеточного взаимодействия, вы обрабатываете клетки обоих типов спаривания трипсином, который

Таблица 14-7. Влияние обработки на агрегирование дрожжевых клеток типов 5 и 21

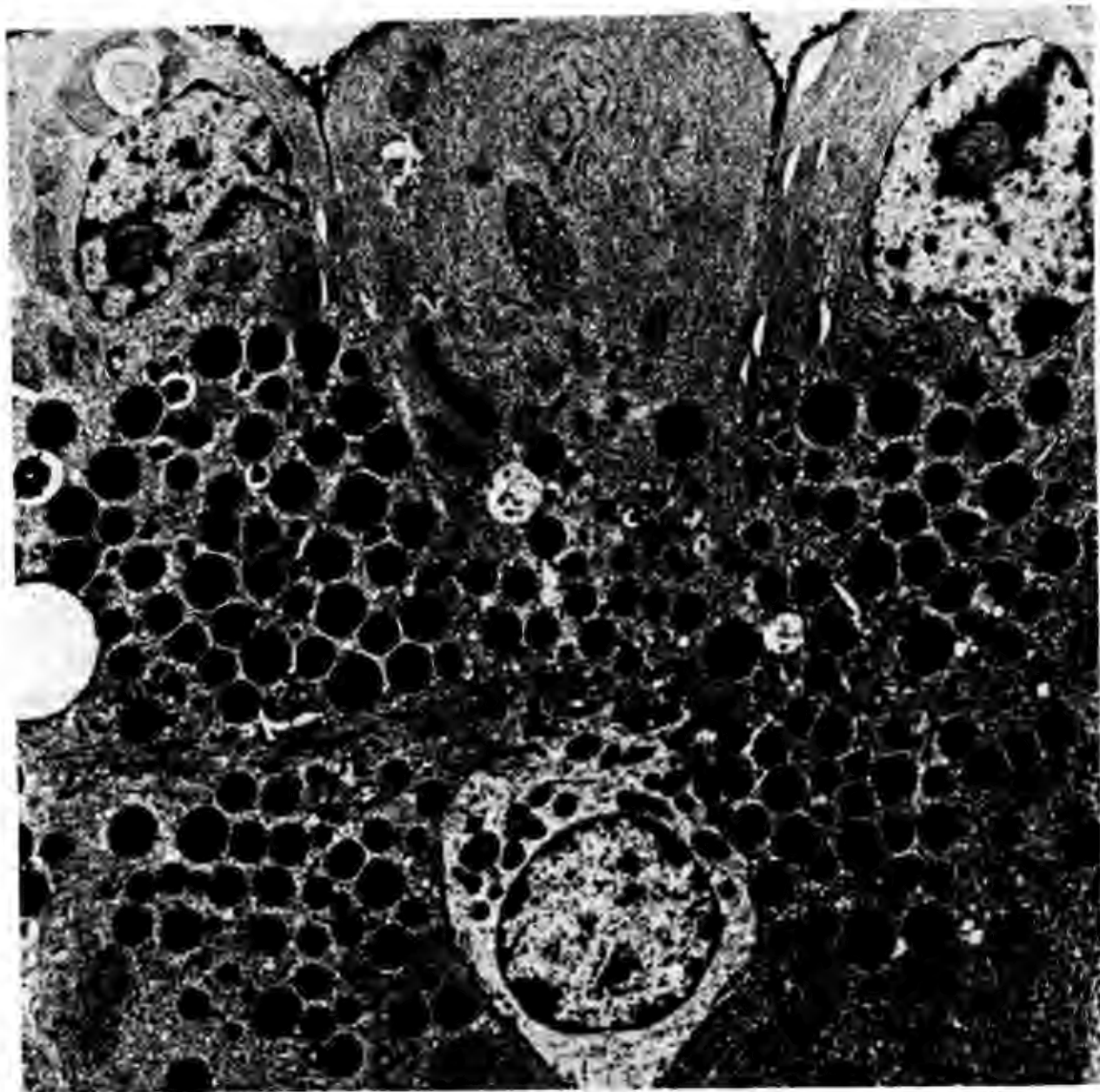
Опыт	Обработка		Агрегирование
	Тип 5	Тип 21	
1	Без обработки	Без обработки	+
2	Трипсин	»—	+
3	Без обработки	Трипсин	—
4	2-меркаптоэтанол	Без обработки	—
5	Без обработки	2-меркаптоэтанол	+

расщепляет белки, и 2-меркаптоэтанолом, который разрушает дисульфидные связи. Результаты приведены в табл. 14-7.

Другая часть исследования состоит в том, что вы выделяете действующий фактор из клеток типа 5, обрабатывая их ферментом, расщепляющим полисахариды. При добавлении к клеткам типа 21 этот фактор вызывает их агрегацию. В присутствии 2-меркаптоэтанол фактор диссоциирует на два компонента с большой и малой молекулярными массами. Каждый из них по отдельности не вызывает агрегацию клеток типа 21. Когда эти компоненты рекомбинируют в условиях, способствующих восстановлению дисульфидных связей, они вновь приобретают способность вызывать агрегацию клеток типа 21.

Опишите механизм взаимодействия между клетками типов 5 и 21.

Ответы



2 мкм

Рис. 5-1. Фотомикрография поджелудочной железы голодавшей морской свинки, полученная с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Фиксация глутаровым альдегидом и тетроксидом осмия, окраска уранилацетатом свинца. (Любезно предоставлена д-ром Б. Гупта.)

Синтез РНК и белка

5-1

- А. РНК-полимераза; транскрипция ДНК
- Б. промотор; сигнал терминации
- В. антикодон; кодон
- Г. аминоацил-тРНК-синтетазы; аминоацил-тРНК
- Д. вырожденный
- Е. рибосома; пептидил-тРНК-связывающий участок; аминоацил-тРНК-связывающий участок
- Ж. пептидилтрансфераза; рРНК
- З. факторы терминации; стоп-
- И. инициаторная тРНК; инициаторный метионин

5-2

- А. Неправильно. Связыванием с промотором определяется как направление движения РНК-полимеразы, так и то, какая из двух цепей будет транскрибироваться, потому что цепь РНК, синтезируемая в направлении от 5'- к 3'-концу, должна быть антипараллельна матричной цепи.
- Б. Правильно.
- В. Правильно.
- Г. Неправильно. Модифицированные нуклеотиды образуются в результате ковалентной модификации стандартных нуклеотидов уже после синтеза РНК.
- Д. Неправильно. Замена одного основания приведет к тому, что тРНК^{Tyr} станет узнавать два сериновых кодона UCU/C (из-за неоднозначности соответствия). В бесклеточной системе вследствие конкуренции между модифицированной тРНК^{Tyr} и нормальной тРНК^{Ser} будет, вероятно, синтезироваться белок, содержащий в положениях, задаваемых UCU и UCC, как серин, так и тирозин. Однако в положениях, определяемых четырьмя другими сериновыми кодонами, будет находиться только серин.
- Е. Правильно.
- Ж. Неправильно. Согласно гипотезе неоднозначного соответствия спаривание происходит между основанием в третьем положении кодона и основанием в первом положении антикодона.
- З. Правильно.
- И. Неправильно. На синтез белка тратится в целом гораздо больше энергии, чем на транскрипцию, потому что на каждой молекуле мРНК образуются сотни и даже тысячи молекул белка.

- К. Неправильно. AUG кодирует также и метионин во внутренней части мРНК; отбор какого-то AUG как сайта инициации зависит от других особенностей нуклеотидной последовательности мРНК.
Л. Правильно.
М. Правильно.

5-3

- А. $5' \text{GUAGCCUACCCAUAGG} 3'$.
Б. Если трансляция начинается с 5'-конца РНК, то синтезированный белок должен иметь последовательность валин-аланин-тирозин-пролин.

Молекула tRNA^{Ala} покидает рибосому только после того, как образуется пептидная связь между аланином и тирозином. Таким образом, следующей тРНК, которая свяжется с рибосомой после отделения tRNA^{Ala} , будет tRNA^{Pro} .

Как только аминокетильная группа аланина образует пептидную связь, эфирная связь между валином и tRNA^{Val} разрывается, tRNA^{Val} отделяется от рибосомы, а tRNA^{Ala} передвигается от А-участка к Р-участку.

- В. Эта короткая мРНК кодирует три различных пептида, так как имеются три разные рамки считывания. Во второй рамке считывания первый кодон является стоп-кодоном UAG; однако последующие кодоны могут транслироваться:

$5' - \text{GUAGCCUACCCAUAGC} - 3'$

рамка 1	V	A	Y	P	*
рамка 2	*	P	T	H	R
рамка 3	S	L	P	I	

На этой ДНК может синтезироваться и другая мРНК:

$5' - \text{CCU AUGGGUAGGCUAC} - 3'$

рамка 1	P	M	G	R	L
рамка 2	L	W	V	G	Y
рамка 3	Y	G	*		

Таким образом, последовательности пептидов будут совершенно различными. Надо быть внимательным к тому, чтобы правильно соблюсти полярность цепей, — очень легко попасть в ловушку, считая, что комплементарная последовательность первой мРНК есть $5' \text{CAUCGGAUGGGUAUCC} 3'$, а это неверно, так как цепи ДНК идут в противоположных направлениях.

- Г. Поскольку в этой последовательности нет кодона AUG или GUG (который иногда используется как стартовый сигнал для трансляции у *E. coli*), она не может относиться к началу кодирующей области гена. Она могла бы относиться к концу гена, если бы использовалась первая или вторая рамка считывания, или к середине гена, если бы использовалась третья рамка считывания. Чтобы разобраться в этих возможностях, нужно иметь больше информации.

5-4

- А. Для преобразования двух аминокислотных последовательностей в соответствующие последовательности оснований мРНК можно использовать генетический код:

дикий тип:	N	M	N	G	K						
	AAU	AUG	AAU	GGU	AAA						
	C		C	C	C						
				A							
				G							
мутант:	N	M	I	W	Q	I	C	V	M	K	D
	AAU	AUG	AUU	UGG	CAA	AUU	UGU	GUU	AUG	AAA	GAU
	C		C		G	C	C	C		G	C
			A			A		A			
								G			

Сравнение этих двух последовательностей мРНК показывает, что мутант несет дополнительное основание U в восьмом положении. Таким образом, мутация со сдвигом рамки возникает из-за встраивания пары оснований АТ в этом положении в ДНК.

- Б. При удалении лишнего U из последовательности мутанта восстанавливается расширенная последовательность дикого типа, которую опять можно перевести в аминокислотную последовательность, как показано ниже:

								*
					W			*
					S	A	S	
N	M	N	G	K	F	V	L	*
AAU	AUG	AAU	GGC	AAA	UUU	GUG	UUA	UGA
C					C	C	C	G
					A		A	
							G	

Первые семь кодонов в расширенной мРНК кодируют аминокислоты однозначно. Восьмой же кодон мог либо кодировать аминокислоту, либо выступать в роли стоп-кодона. Девятый кодон определенно является стоп-кодом. Таким образом, поскольку аспарагин в начале приведенной выше аминокислотной последовательности имеет номер 263, интактный полипептид должен иметь в длину либо 269, либо 270 аминокислот. Два стоп-кодона, повторенные тандемно, довольно часто встречаются в конце кодирующих последовательностей.

5-5

- А. Кодирующая последовательность для белка *Tetrahymena* необычна в том отношении, что в отличие от других микроорганизмов, у которых UAG и UAA являются стоп-кодонами, у *Tetrahymena* они определяют аминокислоту глутамин (Q).
- Б. Белок, образующийся в наименьшем количестве, синтезируется на очищенной мРНК вируса табачной мозаики (ВТМ) в результате того, что считывается кодон, обычно служащий стоп-кодом. Хотя механизм такого редкого события и трудно понять, но можно все же предположить, что оно происходит тогда, когда трансляционная система ретикулоцитов ошибочно встраивает в сайте стоп-кодона аминокислоту, вместо того чтобы закончить синтез. Несколько удивительно то, что второй кодон терминирования не встречается на протяжении 506 кодонов.
- В. Считая, что UAG и UAA используются у *Tetrahymena* как кодоны для глутамина, увеличение доли белка ВТМ, считываемого от

начала до конца, можно объяснить присутствием такой тРНК^{Gln}, у которой антикодон комплементарен нормальному стоп-кодону ВТМ – UAG.

Добавление РНК *Tetrahymena* вызывает незначительный сдвиг в количественном соотношении двух белков, потому что в ней содержится некоторое количество активированной тРНК^{Gln}. Цитоплазма вызывает больший сдвиг, потому что она содержит также соответствующую аминоацил-тРНК-синтетазу. (Увеличение сдвига при добавлении цитоплазмы указывает на то, что тРНК-синтетазы, присутствующие в лизате ретикулоцитов, не могут снова «нагружать» аминокислотой специальную тРНК *Tetrahymena*.) Эти результаты показывают, что по крайней мере два компонента из *Tetrahymena* – специальная тРНК и соответствующая тРНК-синтетаза должны быть добавлены к лизату ретикулоцитов, чтобы могла идти эффективная трансляция мРНК *Tetrahymena*. Эти компоненты эффективно конкурируют с факторами терминации ретикулоцита, обеспечивая считывание мРНК *Tetrahymena*.

- Г. Незначительные вариации в генетическом коде были открыты несколько лет назад и в геномах митохондрий, однако они не столь удивительны, как изменения кода у *Tetrahymena*. В конце концов митохондриальные геномы малы и кодируют сравнительно немного белков, так что не столь трудно представить себе, как могли произойти изменения. Однако геном *Tetrahymena* кодирует тысячи белков. Поразительнее всего то, что этот организм смог пережить предполагаемый переход от стандартного кода к его нынешнему коду.

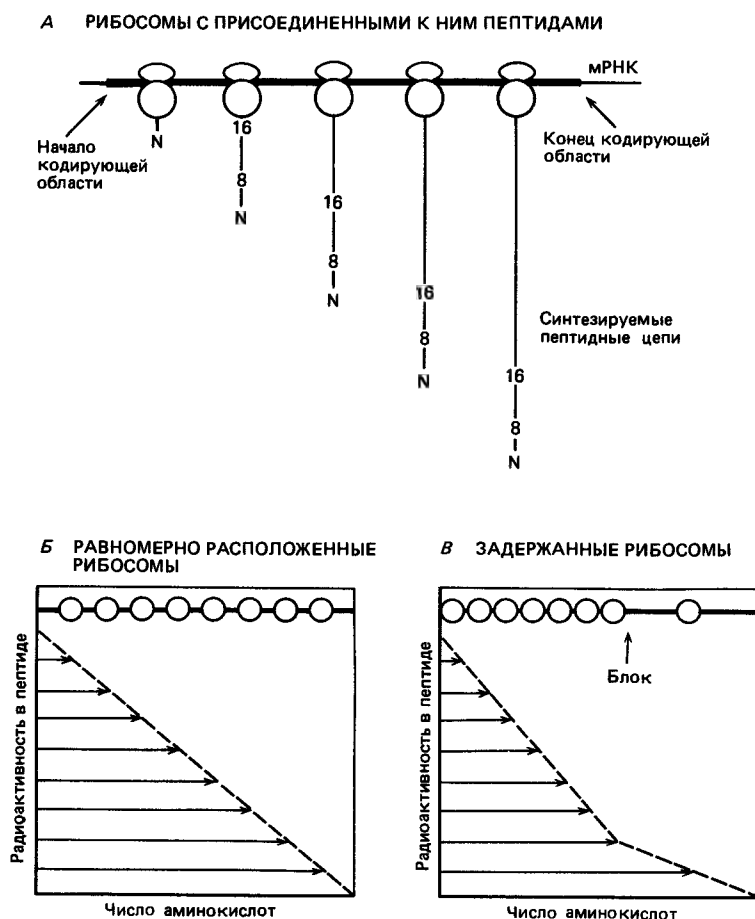
Литература: Horowitz, S.; Gorovsky, M. A. An unusual genetic code in nuclear genes of *Tetrahymena*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2452–2455, 1985.

Andreasen, P. H.; Dreisig, H.; Kristiansen, K. Unusual ciliate-specific codons in *Tetrahymena* mRNAs are translated correctly in a rabbit reticulocyte lysate supplemented with a subcellular fraction from *Tetrahymena*. Biochem. J. 244, 331–335, 1987.

5-6

- А. Данные, представленные на рис. 5-2, показывают, что N-конец белка синтезируется первым. Линейный градиент радиоактивности от начала цепи – N-конца – до ее другого конца именно таков, каким он должен быть согласно модели, показанной на рис. 5-46, А и Б. Здесь все рибосомы несут лизин в положении 8, но рибосома у 5'-конца мРНК еще не достигла лизина в положении 16, поэтому здесь радиоактивность ниже, и так далее по очереди. Практически ни одна из рибосом (в действительности [147–144]/147 или чуть выше 2%) не будет нести лизин в положении 144.
- Б. Углы наклона графиков для α - и β -цепей очень сходны, из чего следует, что синтезируется практически одно и то же количество молекул каждой цепи. Имеющейся информации, однако, недостаточно, чтобы решить, одинаковы ли количества молекул мРНК для α - и β -глобина. Для этого нужно знать, сколько рибосом было на каждой мРНК, т. е. средний размер полирибосом для α - и β -глобиновых мРНК. На самом деле молекул α -глобиновой мРНК в два раза больше, чем молекул β -глобиновой мРНК, но α -глобиновая мРНК менее эффективна, т. е. количество рибосом, которые начинают синтез за единицу времени, на α -глобиновой мРНК меньше, чем на β -глобиновой мРНК. Эти факторы компенсируют друг друга, так что образование двух цепей четко сбалансировано.
- В. График стремится к нулю по мере движения рибосомы к концу кодирующей области. Это означает, что цепи отделяются от

Рис. 5-46. Соотношение между положением рибосомы, длиной пептида и картиной мечения (ответ 5-6). *А.* Длина пептидов, прикрепленных к рибосомам в разных положениях вдоль мРНК α -глобина. Числа относятся к положениям первых двух остатков лизина. *Б.* Картина мечения пептида в случае равномерно расположенных рибосом. *В.* Картина мечения пептидов в случае, когда продвижение рибосом ингибируется посередине молекулы мРНК. Пептиды, присоединенные к каждой рибосоме, показаны стрелками. Острие каждой стрелки соответствует С-концу полипептида и располагается точно под рибосомой, на которой тот синтезируется. Штриховые линии, проходящие по остриям стрелок, показывают ожидаемую картину мечения пептидов.



рибосом сразу, как только достигают стоп-кодона, или по крайней мере без такой паузы, которая была бы видна на графике при данной шкале времени.

Г. Если бы на пути движения рибосом существовала значительная преграда, то получаемые данные были бы сходны с теми, которые представлены на рис. 5-3, *А.* В таком случае расположение рибосом было бы более тесным до преграды и менее тесным за ней по ходу движения. Вариант с ингибированием движения рибосом представлен схематически на рис. 5-46, *В.*¹

5-7

А. Как показано на рис. 5-47, скорость синтеза постоянна во времени. Кривизна профиля, столь очевидная на радиоавтограмме (рис. 5-4), — это результат того, что скорость движения белков в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия не связана линейной зависимостью с их размерами.

¹ В ряде других экспериментов были обнаружены паузы при трансляции глобиновых мРНК. См. Protzel A., Morris A.J. Gel chromatographic analysis of nascent globin chains: Evidence of nonuniform size distribution. J. Biol. Chem., 1974, 249, 4594–4600; Krashennnikov I. A., Komar A. A., Adzhubei I. A. Nonuniform size distribution of nascent globin peptides, evidence for pause localization sites, and a cotranslational protein-folding model. J. Protein Chem., 1991, 10, 445–454. — Прим. ред. перев.

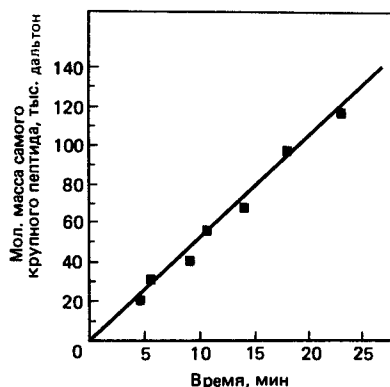


Рис. 5-47. Скорость синтеза белка ВТМ (ответ 5-7).

- Б. Скорость синтеза белка можно определить по углу наклона кривой на рис. 5-47. Соответственно система синтезирует полипептид размером около 52 000 Да за 10 мин, или пептид 5200 Да в минуту, что соответствует 47 аминокислотам в минуту (5200/110). Эта скорость в 10 раз ниже, чем скорость синтеза в клетках *E. coli*, и втрое ниже, чем скорость синтеза глобина в том же лизате ретикулоцитов. Как будет обсуждаться в следующем пункте (В), причина относительно низкой скорости синтеза может заключаться отчасти в том, что смесь молекул тРНК в лизате ретикулоцитов не вполне соответствует белку этого растительного вируса.
- В. На радиоавтограмме присутствует много полос, потому что рибосомы все время продолжают соединяться с мРНК в ходе эксперимента. Вы могли бы получить теоретически рассчитанный результат (рис. 5-5), добавив через 5 мин специфический ингибитор инициации или немеченый метионин в большом избытке. Присутствие дискретных полос, а не сплошного фона полимерного материала предполагает, что в молекуле мРНК есть специфические точки: возможно, это сайты, в которых рибосомы должны некоторое время подождать подхода редких тРНК. Ведь популяция тРНК в ретикулоците предназначена для синтеза глобина, а не белка растительного вируса!

5-8 Последовательность ДНК GGG TAT CTT TGA CTA CGA CGC не должна была бы кодировать последовательность аминокислот белка RF2, так как UGA — это кодон терминации. В этой последовательности должны, по-видимому, нарушаться обычные правила триплетного кода, чтобы лейцил-тРНК могла узнавать выделенный курсивом квадруплет:

GGG TAT CTTT GAC TAC GAC GCC.

По существу рибосома должна сдвигать свою рамку считывания в середину гена!

Мутации со сдвигом рамки первоначально были обнаружены Бензером (Benzer) при исследовании генов *r_{II}* бактериофага T4 и использованы затем Криком (Crick) при открытии триплетного кода. Позже с помощью остроумно спланированного генетического отбора были выделены мутантные молекулы тРНК, которые могли считывать четыре основания сразу. Было показано, что они подавляют определенные мутации со сдвигом рамки. Обнаружить редкие случаи *естественного* подавления сдвига рамки — большой сюрприз для исследователя. Первый такой пример был обнаружен в гене 10 бактериофага T7. После этого было найдено несколько ретровирусов и ретропозонов, которые используют подавление сдвига рамки относительно кодонов терминации как путь для образования минорных продуктов генов. Механизм супрессии в этих случаях неясен и служит предметом продолжающихся исследований.

- Б. Присутствие супрессируемого в пределах рамки считывания кодона UGA (который однозначно узнается белком RF2) в последовательности RF2 указывает на существование новой формы генного контроля. Механизм сдвига рамки пока неясен. Предполагается, что имеет место конкуренция между сдвигом рамки и терминацией на кодоне UGA. Когда уровень RF2 в клетке высок, терминация на UGA-кодоне должна происходить чаще, чем при низком уровне RF2. Таким образом, когда содержание RF2 близко к нужному, будет образовываться очень мало новых молекул RF2, но если оно

снижается, вероятность сдвига рамки для рибосомы будет возрастать и синтез RF2 возобновится. Таким образом, эта ситуация очень напоминает авторегуляцию. Заметьте также, что сдвиг рамки происходит вблизи начала гена, так что на синтез бесполезного полипептида тратится не слишком много энергии.

Это очень привлекательная гипотеза для объяснения регуляции синтеза RF2, однако прямых данных в ее пользу или против нее нет.

Литература: *Craig, W.J.; Cook, R.G.; Tate, W.P.; Caskey, C.T.* Bacterial peptide chain release factors: conserved primary structure and possible frameshift regulation of release factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3616-3620, 1985.

Jacks, T.; Varmus, H. Expression of the Rous sarcoma virus *pol* gene by ribosomal frameshifting. *Science* 230, 1237-1242, 1985.

5-9

- А. Поскольку бактерии инкубировали в присутствии метки на протяжении времени одной генерации, которая означает удвоение массы, то 4 мкг из 8 мкг флагеллина, выделенного из геля, были синтезированы в присутствии ^{35}S -цистеина. Величина радиоактивности образца показывает, что меченый цистеин содержится в одной из 1670 молекул флагеллина (фгл).

$$\frac{\text{Cys}}{\text{фгл}} = \frac{300 \text{ имп/мин Cys}}{4 \text{ мкг фгл}} \times \frac{\text{пмоль Cys}}{5 \times 10^3 \text{ имп/мин}} \times \frac{4 \times 10^4 \text{ мкг фгл}}{\text{мкмоль фгл}} \times \frac{\text{мкмоль}}{10^6 \text{ пмоль}} = \frac{6 \times 10^{-2} \text{ пмоль Cys}}{100 \text{ пмоль фгл}},$$

$$\frac{\text{Cys}}{\text{фгл}} = 6 \times 10^{-4},$$

что равно одной молекуле цистеина на 1670 молекул флагеллина ($1/6 \times 10^{-4}$).

- Б. Нормальные кодоны для цистеина это UGU и UGC. Таким образом, ошибка при взаимодействии кодон антикодон относится к первому положению кодона (третьему положению антикодона). Результаты этого и других экспериментов позволяют предполагать, что рибосомы могут ошибочно считывать U вместо C и C вместо U в первых двух положениях кодонов, а C и U — вместо A в первом положении.
- В. Предполагая, что все шесть аргининовых кодонов равновероятны, получим, что в молекуле флагеллина должно быть шесть чувствительных аргининовых (CGC и CGU) кодонов ($2/6 \times 18$). Следовательно, истинная частота ошибок для одного «кодона с риском» составляет

$$\text{Частота ошибок} = \frac{1}{1670 \text{ молекул фгл}} \times \frac{\text{Число молекул фгл}}{6 \text{ чувствит. кодонов}}$$

частота ошибок = 10^{-4} .

- Г. Если вероятность сделать ошибку в каждом кодоне равна 10^{-4} , то вероятность не сделать ошибку в каждом кодоне равна $(1 - 10^{-4})$. Тогда вероятность не совершить ошибку в n -кодонах будет $(1 - 10^{-4})^n$. Таким образом, доля правильно синтезированных молекул длиной 100 аминокислот составит $(1 - 10^{-4})^{100}$, или 99%. Для белка из 1000 аминокислот эта доля равна 90%. В случае молекул, состоящих из 10 000 аминокислот, будет правильно синтезироваться только 37% молекул. Не удивительно поэтому, что

белки с количеством аминокислот свыше 3000 встречаются очень редко.

Литература: Edelman, P.; Gallant, J. Mistranslation in *E. coli*. Cell 10, 131–137, 1977.

5-10

А. Эдеин специфически ингибирует инициацию синтеза белка, препятствуя соединению 60S-субъединицы рибосомы с комплексом «40S-субъединица/мРНК/инициаторная тРНК». Поскольку элонгация при этом не блокируется, то рибосомы, которые уже начали синтез, завершают построение своих индивидуальных полипептидных цепей и покидают мРНК, так что присоединенными к этой нуклеиновой кислоте остаются только малая субъединица рибосомы и инициаторная тРНК.

Эдеин – это антибиотик, выделяемый некоторыми штаммами *Bacillus brevis*.

Б. Причина того, что синтез белка прекращается не сразу, а после некоторой задержки, связана с механизмом действия эдеина. Он ингибирует инициацию, не затрагивая реакций элонгации в синтезе белка. Таким образом, ничто не мешает рибосоме, которая только что начала синтезировать новый полипептид, довести синтез до конца. Включение метки продолжается в течение всего периода образования исследуемого белка (в данном случае, глобиновых цепей гемоглобина), т.е. около 1 мин.

В. Если циклогексимид (или любой другой ингибитор элонгации) добавляют одновременно с ингибитором инициации, полирибосомы как бы «замирают». Для того чтобы полирибосомы повредились ингибиторами инициации, должно осуществляться продвижение рибосом, а оно блокируется ингибиторами элонгации.

Литература: Safer, B.; Kemper, W.; Jagus, R. Identification of a 48S preinitiation complex in reticulocyte lysate. J. Biol. Chem. 253, 3384–3386, 1978.

Механизмы репарации ДНК

5-11

- А. репарация ДНК; мутация
- Б. фибринопептиды
- В. апуринизация; дезаминирование
- Г. ДНК-репарирующие нуклеазы; ДНК-полимераза; ДНК-лигаза
- Д. АП-эндонуклеаза
- Е. ДНК-гликозилаза
- Ж. крупные повреждения
- З. SOS-ответ

5-12

- А. Правильно.
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. Нуклеотидные последовательности генов гистона H4 у разных видов значительно варьируют, однако изменения связаны по большей части с заменой нуклеотидов в третьем положении кодонов, так что гены кодируют одну и ту же аминокислотную последовательность.
- Г. Правильно.
- Д. Неправильно. Репарация зависит от наличия двух копий генетической информации, находящейся в цепях двойной спирали ДНК.
- Е. Правильно.
- Ж. Правильно.

3. Неправильно. Основное назначение SOS-ответа заключается в том, чтобы понизить точность синтеза ДНК и сделать возможным продолжение репликации после повреждения. Клетка отомрет, если репликация не возобновится, поэтому SOS-ответ - это возможность для выживания, а плата за него - мутация.
- И. Правильно. Дезаминирование А, G или C (Т не несет аминогруппы) приводит к образованию основания, которое неестественно для ДНК. Например, C дезаминируется с образованием U - этим, по-видимому, можно объяснить, почему в ДНК вместо U используется Т. Проблема дезаминирования возникает в клетках эукариот, у которых многие CG-динуклеотиды метилируются в положении 5 углеродного кольца. Дезаминирование 5-метилцитозина дает Т.

5-13

- А. Необычная чувствительность двойных мутантов *uvrArecA* к УФ-свету по сравнению с парами *uvr*-мутантов предполагает, что существуют два пути ответа на повреждение, вызванное УФ-светом. При этом продукты гена *uvr* участвуют в одном пути, а продукт гена *recA* - в другом. Согласно эмпирическому правилу, если комбинация дефектных генов не дает более выраженного мутантного фенотипа по сравнению с отдельными дефектными генами, то продукты генов действуют, вероятно, по одному и тому же биохимическому пути.

Продукты *uvr*-гена образуют *uvrABC*-эндонуклеазу, которая специфически отщепляет олигонуклеотид, состоящий из двенадцати нуклеотидов и содержащий пиримидиновый димер. Белок *recA* вовлекается в два пути, по которым происходит обработка УФ-повреждений: SOS-ответ и рекомбинационную репарацию. Пути, по которым осуществляется участие *uvr*- и *recA*-генов, не полностью независимы друг от друга, так как экспрессия *uvr*-генов существенно возрастает при SOS-ответе.

- Б. В случае штамма *uvrArecA* летальный удар соответствует образованию примерно одного пиримидинового димера. Число пиримидиновых димеров на один летальный удар можно рассчитать следующим образом: поскольку в геноме содержится до 50% GC, то все четыре основания в геноме представлены одинаково. Если они распределены в цепи случайным образом (на самом деле это не так, но данное предположение можно считать допустимым приближением), то из 16 возможных динуклеотидных пар в ДНК четвертую часть составляют пиримидиновые пары; следовательно, в *E. coli* содержится 10^6 возможных мишеней для УФ-света. Если принять условие, что при дозе 400 Дж/м² 1% пиримидиновых пар превращаются в пиримидиновые димеры, то число последних на один летальный удар у *E. coli* составит

$$\frac{\text{Пиримидиновые димеры}}{\text{Летальный удар}} = \frac{10^6 \text{ пиримидиновых пар}}{E. coli} \times \frac{0,04 \text{ Дж/м}^2}{\text{Летальный удар}} \times \frac{1 \text{ пиримидиновый димер}}{100 \text{ пиримидиновых пар}} \times \frac{1}{400 \text{ Дж/м}^2}.$$

$$\frac{\text{Пиримидиновые димеры}}{\text{Летальный удар}} = 1.$$

5-14

- А. Вырезание при репарации поврежденного участка нуклеиновой кислоты, инициируемое *uvrABC*-эндонуклеазой, производится очень точно. Это единственный путь, действующий у штамма *recA*,

чем и объясняется характерная для последнего низкая частота мутаций. Белок, кодируемый *recA*, участвует в двух процессах: в репарации путем рекомбинации, осуществляющейся с большой точностью, и в многоуровневом SOS-ответе, один из этапов которого подвержен частым ошибкам. Именно такой этап ответствен за высокую частоту мутаций у штамма *uvrA*.

Частота мутаций у дикого штамма составляет всего лишь 1% от частоты мутаций у штамма *uvrA*, поэтому у штамма *E. coli* дикого типа должен преобладать способ репарации, характерный для штамма *uvr*. (Важно помнить, однако, что экспрессия эндонуклеазы *uvrABC* увеличивается при SOS-ответе.)

- Б. Включение адениловых нуклеотидов против пиримидиновых димеров должно было дать только одну треть от общего числа мутаций, образующихся в результате случайного встраивания. Вставка произвольного нуклеотида в каждом таком участке могла оказаться правильной только в одном случае из четырех (т.е. в 25% случаев). И наоборот, включение А должно быть правильным в 75% случаев, потому что Т-нуклеотиды составляют 75% пиримидинов в димерах. Все А-нуклеотиды, включенные против СС (10%), как и половина А-нуклеотидов, встроенных против ТС и СТ (15%), будут неправильной заменой. Таким образом, «правило А» — это хорошая стратегия для репарации поврежденной УФ-облучением ДНК. С эволюционной точки зрения «правило А» можно рассматривать как механизм избирательной адаптации к мощному потоку ультрафиолетовой радиации, возникший на ранней стадии развития живого, до того как в результате накопления кислорода атмосфера Земли стала менее проницаемой для ультрафиолета.

- 5-15 Индуцированная экспрессия *lexA* имеет то преимущество, что позволяет быстро вернуться к нормальному состоянию сразу же после окончания повреждающего воздействия. Если опасность для структуры ДНК все еще сохраняется, то *hcsA* будет оставаться в активированном состоянии и вызывать расщепление всех белков *lexA*. Когда повреждение исправлено, одноцепочечная ДНК исчезает, а белок *hcsA* инактивируется. В это время активный *lexA* экспрессируется на максимальном уровне, вызывая резкое отключение SOS-ответа. Если бы белок *lexA* всегда экспрессировался с низкой скоростью, выключение SOS-ответа не могло бы происходить так быстро.

5-16

- А. Равномерное распределение мутаций со сдвигом рамки указывает на то, что УФ-повреждение распределяется по всему гену, поскольку мутация со сдвигом рамки, произошедшая в любом месте гена, обнаруживается с помощью метода слияния генов (которое не зависит от репрессорной функции). Если УФ-повреждение распределяется равномерно, то неслучайное распределение миссенс-мутаций в *lacI*-гене должно отражать функциональную важность концов *lac*-белка. Большинство мутаций на концах гена приводят к образованию нефункционального белка; это дает возможность выявить мутантов. Однако некоторые изменения в средней области гена, которая менее важна для функции белка, могут не влиять на образование функционально активного белка. Эти «молчащие» мутации невозможно выявить по критерию утраты функции.
- Б. Считается, что часто встречающаяся делеция одного нуклеотида в ответ на УФ-повреждение происходит из-за ошибки при синтезе

ДНК, возможной в участках против пиримидиновых димеров. По-видимому, в случае неестественного расположения оснований, обусловленного присутствием пиримидинового димера, при подверженном ошибкам синтезе в растущей цепи ДНК вместо двух нуклеотидов встраивается один. «Горячие точки» сдвига рамки, по-видимому, являются такими потому, что в них содержится много тиминов подряд, и, следовательно, вероятность образования димеров здесь повышена.

Литература: *Miller, J. H.* Mutagenic specificity of ultraviolet light. *J. Mol. Biol.* 182, 45–65, 1985.

- 5-17** Основным переменным фактором в этих опытах является свет. Чем ярче свет, тем менее выражено летальное действие при данной УФ-дозе. Таким образом, видимый свет может обращать эффекты УФ-облучения. Прямое восстановление повреждения, вызываемого УФ-светом, широко распространено у микроорганизмов и называется ферментативной фотореактивацией. Детали механизма неясны, но очевидно, что энергия видимого света каким-то образом используется для расщепления пиримидиновых димеров надвое, в результате чего повреждения ликвидируются. Данное объяснение ненамного проясняет механизм открытой в 1940-х годах Кельнером (A. Kelner) фотореактивации. Исследуя влияние температуры на выживаемость после облучения УФ-светом, Кельнер был заинтригован эффектом другого переменного фактора. Вот его слова: «Были тщательно рассмотрены переменные факторы, которые могли бы объяснить столь значительную вариабельность результатов. Мы использовали стоявшую на столе около окна стеклянную водяную баню, в которую были погружены прозрачные бутылки с облучаемыми спорами. Тот факт, что некоторые из бутылей были освещены сильнее, чем другие, позволял предполагать возможную роль света... Опыты показали, что выдерживание облученной ультрафиолетом суспензии на дневном свете приводит к увеличению выживаемости или восстановления жизнеспособности в 100 000–400 000 раз. В контрольных суспензиях, выдерживавшихся в темноте, ... восстановления не было вовсе».

Литература: *Friedberg, E. C.* DNA Repair. New York: W. H. Freeman, 1984.

5-18

- А.** Приспособительная реакция на низкие уровни МННГ должна быть связана с синтезом нового белка, так как она блокируется в присутствии хлорамфеникола (рис. 5-12). Если бы требовалась активация уже имеющегося белка, хлорамфеникол не подавлял бы адаптацию.
- Б.** Приспособительная реакция могла быть кратковременной по ряду причин. Возможно, как только сигнал к адаптации (т. е. МННГ) удаляли, индуцированный синтез нового белка прекращался. Устойчивость к мутагенному действию МННГ и повышение выживаемости тогда зависели бы от стабильности индуцированного белка. В случае его относительной нестабильности устойчивое состояние должно было быстро нарушиться с утратой белком активности. Даже в случае стабильности белка устойчивость популяции бактерий не могла не понизиться очень быстро из-за обусловленного ростом бактерий разбавления этого белка.

Литература: *Teo, I.; Sedgwick, B.; Kilpatrick, M. W.; McCarthy, T. V.; Lindahl, T.* The intracellular signal for induction of resistance to alkylating agents in *E. coli*. *Cell* 45, 315–324, 1986.

5-19

- А. Как показано на рис. 5-13, интактные бактерии и бактерии, адаптированные к низким уровням МННГ, различаются только по количеству О⁶-метилгуанина. Отсутствие его у адаптированных бактерий коррелирует с низкой частотой мутаций, на основании чего можно предполагать, что О⁶-метилгуанин является мутагенным основанием. По-видимому, мутагенный эффект связан с тем, что это основание может ошибочно спариваться с Т во время репликации.
- Б. Кинетика удаления метильной группы О⁶-метилгуанина имеет своеобразный характер, поскольку количество отщепляемых метильных групп не возрастает во времени, как можно было бы ожидать в случае типичного фермента. К тому же это количество прямо пропорционально количеству очищенного белка, добавленного в реакционную смесь. Одним из возможных объяснений такой кинетики может быть то, что данный фермент очень нестабилен; однако идентичность результатов при инкубации в условиях 5 и 37°C противоречит такому объяснению.
- В. Расчет числа деметилированных оснований на одну молекулу фермента показывает, что каждая молекула фермента отщепляет только одну метильную группу. Следовательно, белок используется стехиометрически, а не каталитически, чем и объясняется своеобразие кинетики. Например, в присутствии 2,5 нг белка из ДНК удаляется 0,13 пмоль (0,5 × 0,26 пмоль) метильных групп. Таким образом, число молекул фермента равно:

$$\begin{aligned} \text{Число молекул фермента} &= 2,5 \text{ нг} \times \frac{\text{нмоль}}{19\,000 \text{ нг}} \times \frac{6,0 \times 10^{14} \text{ молекул}}{\text{нмоль}} \\ &= 7,9 \times 10^{10} \text{ молекул,} \end{aligned}$$

а число метильных групп равно:

$$\begin{aligned} \text{число метильных групп} &= 0,13 \text{ пмоль} \times \frac{6 \times 10^{11} \text{ метильных групп}}{\text{пмоль}} = \\ &= 7,8 \times 10^{10} \text{ метильных групп.} \end{aligned}$$

Оказывается, отщепленная метильная группа переносится на определенный остаток цистеина в этом белке. Как только последний метилируется, он перестает функционировать и в конечном итоге разрушается. Поскольку метилтрансфераза инактивируется во время реакции, она не является ферментом в обычном смысле этого слова — фермент-катализатор, который по определению не расходуется во время реакции. Заметьте, что механизм репарации при образовании О⁶-метилгуанина сходен с механизмом ферментативной фотореактивации (задача 5-17): в обеих реакциях происходит непосредственное обращение процессов, вызвавших повреждение ДНК.

Литература: Lindahl, T.; Demple, B.; Robins, P. Suicide inactivation of the *E. coli* O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase. EMBO J. 1, 1359-1363, 1982.

Механизмы репликации ДНК

5-20

- А. ДНК-полимераза
Б. репликативная (репликационная) вилка ДНК

- В. фрагменты Оказаки
- Г. ДНК-лигаза
- Д. ведущая (лидирующая) цепь; отстающая (запаздывающая) цепь
- Е. затравочная (праймерная) цепь
- Ж. экзонуклеазная
- З. РНК-праймаза
- И. ДНК-геликаза
- К. белки, вызывающие дестабилизацию спирали (белки, связывающиеся с одноцепочечной ДНК, или SSB-белки)
- Л. коррекция неправильного спаривания
- М. точки начала репликации
- Н. ДНК-топоизомеразы

5-21

- А. Правильно. (Если репликативная вилка движется вперед со скоростью 500 п.н./с, то ДНК впереди вилки должна вращаться со скоростью $500/10,5 = 48$ об/с, или 2880 об/мин.)
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. Последовательность нуклеотидов в синтезируемой цепи совершенно отличается от последовательности родительской цепи, несмотря на то что две цепи связаны комплементарно спаренными основаниями.
- Г. Правильно.
- Д. Неправильно. Весь синтез ДНК проходит в направлении от 5'-к 3'-концу. ДНК отстающей цепи собирается из фрагментов, которые соединяются воедино позже, так что отстающая цепь удлиняется в направлении от 3'-к 5'-концу.
- Е. Правильно.
- Ж. Неправильно. В отсутствие (3' → 5')-корректирующей экзонуклеазной активности в синтезированной ДНК будет гораздо больше ошибок.
- З. Неправильно. Белки, связывающиеся с одноцепочечной ДНК, держат две цепи ДНК разделенными посредством присоединения к их фосфатным остовам; при этом основания остаются свободными, так что они могут служить матрицей для синтеза ДНК.
- И. Неправильно. Действие репаративной системы, зависящей от метилирования, основано на том, что метильные группы есть в родительской цепи, но отсутствуют в растущей цепи; именно это и позволяет их различать.
- К. Правильно.
- Л. Правильно.
- М. Правильно.

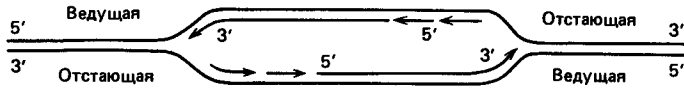
5-22

- А. Указанный фосфат (Р) находится на 5'-конце того фрагмента, к которому он прикреплен.
- Б. Промежуток будет заполняться путем непрерывного репаративного синтеза ДНК, начинающегося от указанной на нижней цепи ОН-группы и продолжающегося в направлении от 5'-к 3'-концу (влево), до фосфатной группы (Р) на соседнем фрагменте.
- В. При отсутствии ДНК-лигазы два фрагмента нижней цепи останутся несоединенными даже после того, как заполнится промежуток между ними.

5-23

- А. Репликационный глазок с двумя репликативными вилками, движущимися в противоположных направлениях, изображен на рис. 5-48.

Рис. 5-48. Маркированная схема репликационного глазка (ответ 5-23).



- Б. Четыре наблюдавшиеся чаще всего структуры, а также те структуры, которые не были обнаружены, представлены на рис. 5-49. В какой-то мере неожиданно то, что часто встречались структуры типа 1 и 3, у которых в одной или обеих вилках нет одноцепочечной ДНК. Эти структуры могли образоваться в результате сильно асинхронного роста в вилке (когда ведущая цепь замедляется, пока запаздывающая цепь ее не догонит); с другой стороны, они могут представлять собой артефакты, возникающие в процессе изготовления препарата ДНК для электронно-микроскопического исследования. Возможно и то, что одноцепочечные участки были слишком короткими, чтобы их можно было отличить от двухцепочечной ДНК.

Литература: Inman, R. B.; Schnos, M. Structure of branch points in replicating DNA: presence of single-stranded connections in lambda DNA branch points. J. Mol. Biol. 56, 319–325, 1971.

5-24

- А. Использование различных меток для Т- и С-нуклеотидов позволяет проследить за процессом их удаления из полимера. Радиоактивный распад изотопа ^{32}P , обладающего высокой энергией, можно легко отличить с помощью сцинтилляционного счетчика от распада изотопа ^3H , обладающего довольно низкой энергией. Измерение можно было сделать и при использовании одного изотопа, хроматографически разделив отщепленные нуклеотиды, однако такая процедура занимает гораздо больше времени.
- Б. Вследствие того что по своей нуклеазной активности ДНК-полимераза I является экзонуклеазой (т. е. она отщепляет нуклеотиды с концов цепей), Т-нуклеотиды не могут быть отщеплены, пока не будут удалены все С-нуклеотиды, из-за этого возникает задержка.
- В. Если в реакционную смесь добавлен дезокситимидинтрифосфат (dTTP), то сразу же, как только появляется соответствующая АТ-пара, начинается полимеризация. От неправильно спаренной АС-пары полимеризация не может начаться. Скорость полимеризации превышает на два-три порядка скорость экзонуклеазной реакции, поэтому меченые Т-остатки будут быстро «исчезать» с конца цепи, становясь недоступными для действия экзонуклеазы.
- Г. Присутствие дезоксицитидинтрифосфата (dCTP) не будет влиять на результаты. Поскольку матрицей служит poly(dA), С-нуклео-

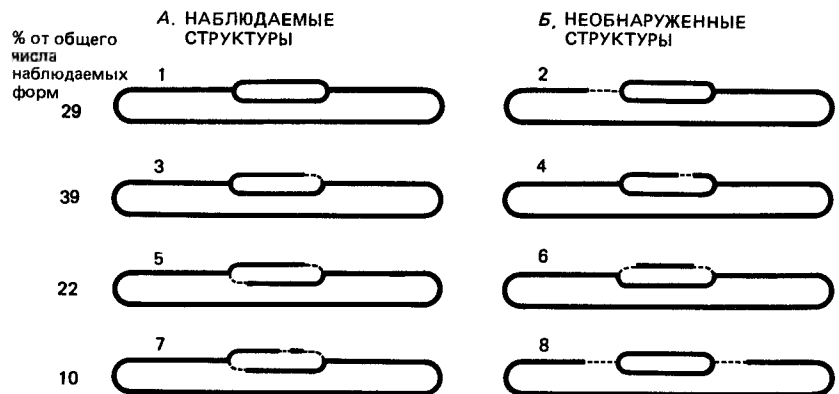


Рис. 5-49. Структуры, которые наблюдались и не наблюдались в реплицирующихся молекулах ДНК бактериофага лямбда (ответ 5-23). Частота встречаемости различных структур указана слева.

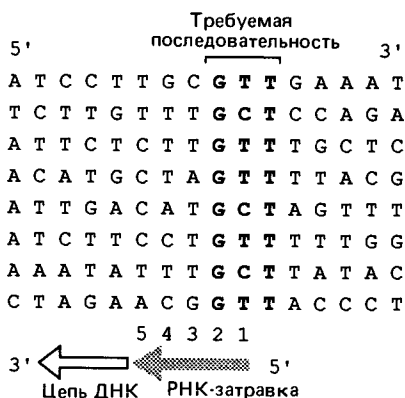


Рис. 5-50. Стартовые сайты и сигнальная последовательность для РНК-затравки (ответ 5-25).

тиды не могут включаться. Если такое событие все же произойдет по ошибке, то неправильно спаренный С не будет служить праймером для полимеризации.

Литература: *Brutlag, D.; Kornberg, A.* Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. 36. A proofreading function for the 3' to 5' exonuclease activity in deoxyribonucleic acid polymerases. *J. Biol. Chem.* 247, 241–248, 1972.

- 5-25** Сравнение матричных последовательностей и последовательностей продуктов рестрикции позволяет определить первые 5 нуклеотидов, с которых начинаются цепи ДНК-продуктов, как показано на рис. 5-50. (Следует помнить, что цепи ДНК идут антипараллельно друг другу.) Необходимая для начала синтеза РНК матричная последовательность это 5'-GPyT-3' (где Py -любое пиримидиновое основание). Молекулы РНК-затравки начинаются с пуринового нуклеотида, противостоящего любому пиримидину в матрице. Сравнение больших участков последовательностей позволяет предположить, что для начала синтеза РНК нужны только три приведенных выше нуклеотида.

Литература: *Cha, T. A.; Alberts, B. M.* Studies of the DNA helicase-RNA primase unit from bacteriophage T4. A trinucleotide sequence on the DNA template starts RNA primer synthesis. *J. Biol. Chem.* 261, 7001–7010, 1986.

5-26

- А.** Гидролиз АТФ необходим для расплетания спирали ДНК, потому что плавление ДНК идет с затратой энергии. Разделение цепей энергетически невыгодно из-за того, что на преодоление стекинг-взаимодействий между плоскими гетероциклами спаренных оснований тратится много энергии. К тому же водородные связи, которыми соединены основания каждой пары, создают кинетический барьер для разделения цепей.
- Б.** Поскольку *dnaB* выплавляет только 3'-полуфрагменты субстрата 3, он должен связываться с длинной одноцепочечной молекулой и двигаться вдоль нее в направлении от 5'- к 3'-концу, пока не достигнет двухцепочечного района, образованного 3'-полуфрагментом. Затем *dnaB* начинает раскручивать этот фрагмент. Движение *dnaB* от 5'- к 3'-концу предполагает, что он расплетает родительский дуплекс в репликативной вилке, двигаясь вдоль отстающей цепи.

Если *dnaB* движется в направлении от 5'- к 3'-концу, то почему он не плавит 5'-полуфрагмент субстрата 3, связываясь с коротким 5'-«хвостом»? Не удивляет ли это вас? На самом деле в экспериментах небольшое количество 5'-полуфрагмента выплавляется. Считается однако, что плавление, обусловленное коротким 5'-«хвостом», является неэффективным из-за различия в размере мишени: гораздо более вероятно, что *dnaB* связывается с длинной одноцепочечной структурой, а не с короткой.

- В.** Если SSB-белок добавляли первым, он ингибировал расплетание, опосредованное *dnaB*, потому что обволакивал одноцепочечную ДНК, препятствуя связыванию с ней *dnaB*. И наоборот, если SSB-белок добавляли после того, как *dnaB* связался, он стимулировал расплетание, предохраняя раскрученную молекулу ДНК от реассоциации.

Литература: *LeBowitz, J. H.; McMacken, R.* The *Escherichia coli dnaB* replication protein is a DNA Helicase. *J. Biol. Chem.* 261, 4738–4748, 1986.

- 5-27** Как всегда вы вышли победителем. Вначале вы были поставлены в тупик разнообразием структур, но быстро обнаружили, что

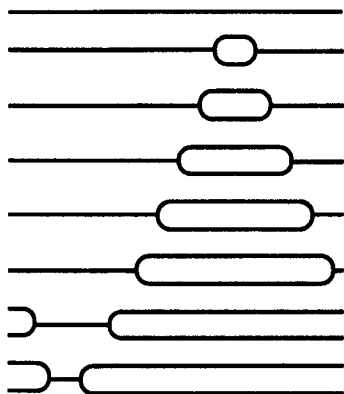


Рис. 5-51. Двухнаправленная репликация из одной точки начала репликации (ответ 5-27).

5-28

- А. Во всех случаях, когда мутация затрагивает какой-либо один из белков, необходимых для продвижения репликативной вилки, будет проявляться «быстро останавливающийся» фенотип, потому что вилка не способна продвигаться вперед без функционирования этих белков. Это значит, что температурочувствительные мутанты по ДНК-топоизомеразе I (не способные снимать скручивающее напряжение перед репликативной вилкой), мутанты по белку, дестабилизирующему спираль (не способные стабилизировать одноцепочечную ДНК в этой вилке), а также мутанты по ДНК-геликазе (не способные расплавлять ДНК впереди репликативной вилки) и мутанты по РНК-праймазе будут проявлять «быстро останавливающийся» фенотип. Трудно объяснить только фенотип мутанта по РНК-праймазе. Этот фермент непосредственно затрагивает синтез отстающей цепи, но он не нужен для синтеза ведущей цепи. У такого мутанта «быстро останавливающийся» фенотип может возникать вследствие одного из двух косвенных эффектов: 1) из-за доступности в достаточном количестве одноцепочечной ДНК, способной связать весь запас белка, дестабилизирующего спираль, или 2) из-за взаимодействия с ДНК-геликазой, которая связывается с РНК-праймазой как частью праймосомы.

При мутациях в белках, не участвующих в продвижении репликационной вилки, будет проявляться «медленно останавливающийся» фенотип. Таким образом, мутация по температурочувствительному белку инициации будет давать «медленно останавливающуюся» картину репликации, так как молекулы ДНК, которые уже прошли ступень инициации, при повышении температуры должны продолжать репликацию вдоль хромосомы, пока не подойдет следующая ступень инициации. Подобным образом мутация по температурочувствительной ДНК-лигазе даст «медленно останавливающийся» фенотип, так как продвижение репликативной вилки вперед не будет останавливаться полностью. Репликация прекратится только в следующем цикле, когда начнут «обнажаться» надрезы на матричной цепи ДНК.

- Б. Смешанные экстракты должны быть полностью компетентны в отношении репликации ДНК при 42 °С, т.е. смесь должна обнаруживать немутантный фенотип. Экстракты, дефектные по ДНК-геликазе, содержат нормальную ДНК-лигазу, а экстракты, дефектные по ДНК-лигазе, обеспечивают нормальной ДНК-геликазой. Таким образом, в смешанном экстракте должен быть представлен весь комплемент нормальных белков. Эта взаимная коррекция экстрактов с разными нехватками называется комплементацией. (Из-за чрезвычайной сложности процесса репликации

ДНК и из-за большого числа участвующих в нем белков бесклеточные экстракты не способны поддерживать репликацию ДНК бесконечно долго. На практике часто трудно провести различие между поведением экстрактов из «медленно останавливающихся» мутантов и поведением экстрактов из немутантных клеток.)

Механизмы генетической рекомбинации

5-29

- А. общая рекомбинация
- Б. ступенчатое (гетеродуплексное) соединение
- В. ренатурация (гибридизация) ДНК; нуклеация спирали
- Г. белок гесА
- Д. миграция ветвей (направленная миграция ветвей)
- Е. обмен с перекрещиванием цепей; структура Холлидея
- Ж. конверсия генов
- З. сайт-специфическая

5-30

- А. Правильно.
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. Это утверждение было бы верным для гесBCD-белка. Белок гесА нужен для спаривания гомологичных дуплексов.
- Г. Правильно.
- Д. Правильно.
- Е. Неправильно. Взаимопревращения перекрещенных и неперекрещенных пар цепей могут происходить за счет вращательных движений, для которых не требуется разрыва цепей.
- Ж. Неправильно. Конверсия генов не имеет отношения к изменению пола; с ней связано неравное распределение родительских аллелей у потомства.
- З. Правильно.
- И. Правильно.

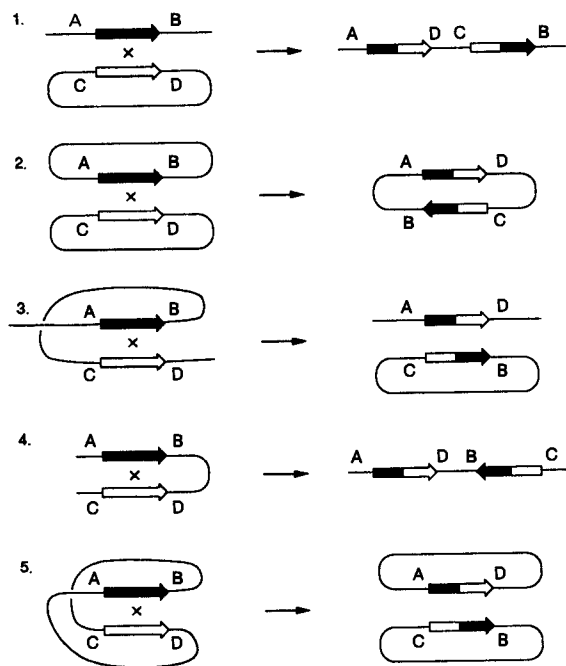
5-31 Субстраты и продукты рекомбинации показаны на рис. 5-52. Для того чтобы сделать заключение о продуктах рекомбинации, нужно в первую очередь расположить гомологичные сегменты определенным образом, а именно разместить стрелки одну над другой так, чтобы они были направлены одинаково. Для этого нужно, чтобы молекулы субстратов 3, 4 и 5 изогнулись. Только при таком расположении может образоваться соединение Холлидея. В этом легко было бы убедиться, если бы удалось использовать реальные последовательности вместо изображающих их стрелок.

Субстраты 3 и 4 иллюстрируют полезное правило; рекомбинация между прямыми повторами в хромосоме (как в субстрате 3) приводит к потере одной копии повтора и промежуточной ДНК; рекомбинация между инвертированными повторами в хромосоме (как в субстрате 4) сопровождается обращением отрезков ДНК между повторами.

5-32

- А. Белок гесBCD должен разрезать ДНК в Хи-сайте (или вблизи него), потому что фрагмент, состоящий из 400 нуклеотидов, образуется из субстрата, меченого на левом конце (рис. 5-25, дорожка 2), а фрагмент, состоящий из 100 нуклеотидов, образуется из субстрата, меченого на правом конце (дорожка 5). Эти отрезки

Рис. 5-52. Расположение сегментов и кроссинговер в разных субстратах рекомбинации (ответ 5-31).



указывают на положение Хи-сайта в исходном фрагменте ДНК (рис. 5-24). Поскольку более короткие меченые фрагменты образуются только тогда, когда помечена верхняя цепь (5'L и 3'R), гесBCD должен разрезать только эту верхнюю цепь. Этот результат означает, что гесBCD узнает ориентацию Хи-сайта; если бы Хи-сайт оказался в этом эксперименте перевернут, то была бы разрезана нижняя цепь.

- Б. Способность гесBCD разделять цепи ДНК иллюстрируется тем, что контроль, не подвергнутый кипячению, неотличим от образца, подвергнутого кипячению (рис. 5-25, сравните дорожки 5 и 6). Если бы гесBCD просто связывался с Хи-сайтом, создавая лишь надрез цепи, то одноцепочечный 100-нуклеотидный фрагмент должен был остаться прикрепленным к исходному фрагменту.
- В. Эти результаты указывают на то, что гесBCD стимулирует гомологичную рекомбинацию в районе Хи-сайта, надрезая одну цепь, а затем выплавляя одноцепочечный «ус». Эта одиночная цепь в присутствии гесА может быть использована для поиска гомологичной последовательности на другом дуплексе и тем самым для инициации образования межцепочечного обмена.

На основе этих и других экспериментов было высказано предположение, что гесBCD связывается с концом линейной двухцепочечной ДНК (в случае бактериальных клеток это разрезанный дуплекс, так как их хромосома в нормальном состоянии имеет кольцевую форму), а затем проходит по молекуле ДНК, расплетая цепи дуплекса. Обычно цепи ренатурируют позади гесBCD, и лишь в непосредственной близости от него они остаются в форме денатурированного глазка (см. МБК, рис. 5-57). Когда гесBCD достигает Хи-сайта, ориентированного соответствующим образом, он разрезает одну цепь. Дальнейшее расплетание после Хи-сайта приводит к возникновению одноцепочечного «хвоста», который способен начать гомологичную рекомбинацию в присутствии гесА, спариваясь с гомологичным дуплексом. Общий итог

процесса – репарация разрыва в первоначальной двухцепочечной ДНК.

Литература: Ponticelli, A. S.; Schultz, D. W.; Taylor, A. F.; Smith, G. R. Chi-dependent DNA strand cleavage by recBCD enzyme. *Cell* 41, 145–151, 1985.

5-33

- А. Если связывание насыщается при весовом соотношении нуклеотидов и SSB-белка 1:12, то число нуклеотидов на одну молекулу этого белка будет равно 8,8:

$$\frac{\text{Число нуклеотидов}}{\text{Молекула SSB-белка}} = \frac{1}{12} \times \frac{35\,000 \text{ Да (SSB-белок)}}{\text{Молекула SSB-белка}} \times$$

$$\times \frac{1 \text{ нуклеотид}}{330 \text{ Да (нуклеотид)}} = 8,8 \text{ нуклеотидов/молекула SSB-белка.}$$

- Б. Если на отрезок одноцепочечной ДНК длиной 3,4 нм приходится 10 нуклеотидов, то 8,8 нуклеотидов будут занимать в длину 3 нм (если бы одноцепочечная ДНК была полностью вытянута, она была бы вдвое длиннее). Поскольку длина молекулы SSB-белка равна 12 нм, при насыщении этим белком его молекулы скорее всего контактируют друг с другом и частично перекрываются.
- В. Незначительное связывание при низкой концентрации SSB-белка, но почти количественное при его десятикратном весовом избытке предполагает, что связывание SSB-белка с ДНК носит кооперативный характер. Кооперативность означает, что как только связывается один мономер, последующие мономеры могут связываться гораздо легче. Если такие мономеры действительно перекрываются друг с другом при связывании, то, как следует из расчета, приведенного в предыдущем пункте, кооперативность легко понять как ситуацию, при которой у каждого мономера имеются два участка связывания – один для ДНК, а другой для других мономеров. При этих условиях связывание первого мономера с ДНК будет более слабым, чем связывание последующих. Это происходит потому, что первый мономер присоединяется к ДНК только через участок связывания ДНК, тогда как второй мономер располагается рядом с первым, в результате чего используются оба связывающих участка его молекулы. При графическом изображении этого типа взаимодействия получается круто восходящая кривая связывания в зависимости от концентрации.

Литература: Alberts, B. M.; Frey, L. T4 bacteriophage gene 32: a structural protein in replication and recombination of DNA. *Nature* 227, 1313–1318, 1970.

5-34

- А. Первый меченый рестрикционный фрагмент, который должен появиться после начала реакции, это фрагмент с, затем метка постепенно появляется и в других фрагментах, так что фрагмент а будет последним, который становится двухцепочечным. Поскольку спаривание происходит между антипараллельными цепями ДНК, этот порядок появления меченых фрагментов означает, что инвазия начинается с 3'-конца (–)-цепи линейной ДНК и миграция ветвей продолжается в направлении 3' → 5' вдоль (–)-цепи.
- Б. Для того чтобы пометился последний фрагмент, требуется 20 мин. Это означает, что скорость продвижения точки ветвления составляет около 350 нуклеотидов в минуту (7000 нуклеотидов/20 мин), или около 6 нуклеотидов в секунду. По сравнению со скоростью

Есть и другой способ выяснить соотношение между соединением Холлидея и продуктами рекомбинации: сегмент нижнего дуплекса в структуре Холлидея с разорванными 5'-цепями закрыть слева, а сегмент верхнего дуплекса – справа от места перекрещивания. То, что остается незакрытым – верхний из двух дуплексов продукта; далее, чтобы увидеть целиком продукт, вращением сегмента нижнего дуплекса 5'-цепь нужно перевести наверх.

При репликации начальных продуктов рекомбинации сегменты гетеродуплексов полностью формируются, и в итоге можно видеть более правильную картину рекомбинантов чем та, что обнаруживается в реальном эксперименте. Заметьте, что если все четыре разрыва находятся на одной и той же цепи (на 3'-цепи в данном случае), то окончательным результатом будет введение информации в виде короткого сегмента из одного дуплекса в другой (на рис. слева). Если два разрыва находятся в 5'-цепях, а два – в 3'-цепях, то продуктами рекомбинации будут кроссоверные дуплексы (на рис. справа).

5-36

- А. Ваш коллега прав. Поскольку точка перекрещивания у всех молекул находится на одном и том же расстоянии от определенной последовательности (уникального сайта, узнаваемого рестриктазой), то последовательности, вовлекаемые в кроссинговер, должны быть гомологичными. Учитывая то, что они находятся на произвольных расстояниях от сайта рестрикции, можно считать, что не существует каких-либо предпочтительных сайтов для рекомбинации.
- Б. Если вы повторите опыты на штамме *E. coli*, дефектном по *recA*, то фигур типа восьмерки или χ -форм не должно обнаружиться.
- В. Если бы фигуры типа восьмерки были промежуточными продуктами сайт-специфической рекомбинации между мономерами, то у всех χ -форм должна была быть одна и та же точка перекрещивания.
- Г. Если бы фигуры типа восьмерки были продуктами негомологичной, происходящей случайным образом рекомбинации между мономерами, то χ -формы должны были бы иметь четыре плеча разной длины.

Литература: Potter, H.; Dressler, D. On the mechanism of genetic recombination: electron microscopic observation of recombination intermediates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3000–3004, 1976.

Вирусы, плазмиды и транспозоны

5-37

- А. бактериофаги
- Б. лизироваться
- В. капсид
- Г. имеющие оболочку
- Д. РНК-зависимая РНК-полимераза; репликаза
- Е. вирус с позитивным геномом; вирус с негативным геномом
- Ж. лизогенные; провирус
- З. лизогенные бактериофаги
- И. непермиссивные
- К. неопластическая трансформация
- Л. ретровирусы, обратная транскриптаза
- М. транспозирующие (подвижные) элементы; транспозазы

- Н. ретротранспозон
- О. плазмиды
- П. вириоды
- Р. трансдукция

5-38

- А. Неправильно. Когда ДНК фага Т4 внедряется в клетку, экспрессия его «ранних» генов полностью зависит от РНК-полимеразы клетки-хозяина. Позже фаг модифицирует клеточную РНК-полимеразу таким образом, что та узнает другие вирусные промоторы, и это приводит к координированной экспрессии генома Т4.
- Б. Неправильно. Хотя большую часть необходимых ферментов обеспечивает механизм репликации клетки-хозяина, однако даже мелкие вирусы обладают способностью производить специальные белки, необходимые для инициации синтеза собственной ДНК. Если бы они были лишены такой способности, то оказались бы под действием строгих правил репликации хромосом, позволяющих осуществить только один круг репликации за время жизни одного клеточного поколения, так что многочисленные циклы репликации вирусов были бы невозможны.
- В. Неправильно. Негативные геномы РНК-содержащих вирусов действительно не служат непосредственно в качестве мРНК, но комплементарные им РНК могут выполнять эту роль; таким образом, негативные геномы содержат гены.
- Г. Правильно.
- Д. Правильно.
- Е. Правильно.
- Ж. Неправильно. Многие вирусы, выходящие из клетки путем отпочковывания от плазматической мембраны, не вызывают рак; известно также, что есть клетки, трансформированные онкогенными вирусами, которые вовсе не производят новые вирусные частицы.
- З. Неправильно. Рост некоторых РНК-содержащих вирусов ингибируется актиномицином D. Ретровирусы, например, ингибируются актиномицином D потому, что они сначала превращаются в ДНК с участием обратной транскриптазы, а затем транскрибируются обычным путем, который чувствителен к актиномицину D. Было бы правильно сказать, что «если рост вируса не ингибируется актиномицином D, то это должен быть РНК-содержащий вирус».
- И. Неправильно. Транспонируемые элементы встраиваются по существу случайным образом, и гены часто разрушаются или изменяются в процессе такой интеграции.
- К. Правильно.
- Л. Неправильно. Считается, что перекрывающиеся гены возникли в процессе эволюции в ответ на давление отбора, чтобы оптимально использовались мелкие геномы, величина которых ограничена размерами капсида.
- М. Правильно.

5-39

- А. Суспензия фага разбавлялась в 1000 раз (0,1 мл/100 мл) в результате смешивания с бактериальной культурой, следовательно, начальный титр фага равнялся 10^7 фаговых частиц/мл (10^{10} фаговых частиц/мл $\times 1/1000$).
- Б. Титр фага через 5 мин. был почти в 10 раз ниже первоначального. Такое начальное снижение титра происходит из-за того, что фаги адсорбируются на бактериях и вводят в них свою ДНК. Поскольку инфекционность зависит от интактных фаговых частиц, титр при

этом понижается. Низкий титр через 5 мин определяется теми фаговыми частицами, которые еще не адсорбировались на бактериях.

- В период первых исследований эта начальная потеря титра (которая была названа скрытой фазой инфекции) представлялась загадочной, потому что, казалось, означала разрушение родительских фаговых частиц до того, как могли быть построены новые фаговые частицы. Теперь трудно понять это недоумение, но вспомните, что в то время основной моделью биологического роста было клеточное деление, при котором деструкция родительского организма полностью исключает возникновение потомства.
- В. Титр фага возрастал медленнее в контрольных пробах, потому что многие фаговые частицы (90% общего количества в интервале времени от 20 до 40 мин) находились внутри бактерий, убитых хлороформом. Инкубация с лизоцимом приводит к разрушению бактерий и высвобождению содержащихся в них фаговых частиц. Титр контрольных проб в конечном счете достигал уровня проб, обработанных лизоцимом, потому что бактерии разрывались (лизировались) естественным образом в конце цикла инфекции. Лизис регулируется фаговыми частицами таким образом, чтобы до того, как разрушится клетка-хозяин, образовалось максимальное число частиц.
- Г. Исходная смесь содержала равные количества бактерий и фагов (10^7 /мл), т. е. фаговых частиц было достаточно для инфицирования каждой бактерии. Поскольку вначале было 10^7 бактерий в 1 мл, а в конце появилось 10^9 фаговых частиц/мл, то на каждую бактерию приходится по 100 фаговых частиц.

На самом деле расчет числа фагов на *инфицированную* бактерию не столь прост, как в этом примере. Необходимо учитывать одно важное обстоятельство: наличие бактерий и фагов в численном отношении 1:1 вовсе не означает, что каждая бактерия заражена одним фагом. Большинство бактерий именно так и будет инфицировано, но некоторые окажутся заражены двумя или большим числом фаговых частиц, а некоторые не будут заражены вовсе. Долю бактерий каждой из этих групп можно рассчитать с помощью распределения Пуассона. Согласно этому распределению, доля незараженных бактерий равна

$$P_0 = e^{-x},$$

где P_0 - вероятность того, что заражение не произойдет, а x - отношение числа фаговых частиц к числу бактерий, при $x = 1$ $P_0 = 0,37$. Таким образом, только 37% бактерий будет инфицировано. В результате число фагов на одну *инфицированную* бактерию составит 160.

Принцип расчета, иллюстрируемый этим примером, используется при анализе различных явлений и в других областях биологии. См., например, задачу 5-13, в которой после одного летального «удара» ультрафиолетовым светом все-таки выжило 37% клеток облученной популяции.

- 5-40 В принципе существует несколько различных путей, по которым вирус герпеса мог бы мутировать, чтобы приобрести устойчивость к ацикловиру. Например, мутации в гене тимидинкиназы либо в гене ДНК-полимеразы могли бы изменить специфичность ферментов так, что они больше не узнавали бы ацикловир или ацикло-GTP, или же мутация могла бы полностью исключить возможность образования продуктов этих генов. При мутации,

вызывающей элиминацию тимидинкиназы вируса герпеса, его жизнеспособность сохраняется, так как этот вирус может использовать тимидинкиназу клетки-хозяина. Однако мутации, элиминирующие ДНК-полимеразу вируса герпеса, летальны для него. Очевидно, вирус герпеса нуждается в своей особой ДНК-полимеразе, которую не может заменить ДНК-полимераза клетки-хозяина.

5-41

А. Описанный здесь тест с кружками - это разновидность классического теста на комплементацию, который позволяет решить, дефектны два мутанта по одному и тому же гену или по разным генам. Если пара мутантов дефектна по одному и тому же гену, они не могут «помочь» друг другу при инфицировании (так как им обоим недостает продукта одного и того же гена) и, следовательно, при смешанной инфекции они растут не лучше, чем порознь. Напротив, если два мутанта имеют дефекты в разных генах, они могут «помочь» друг другу: в смеси будет присутствовать по крайней мере одна функциональная копия каждого гена, и, следовательно, они смогут расти как смесь мутантов.

Результаты теста с кружками в случае r_{II} -мутантов показывают, что последние разделяются на две группы по комплементации. Мутанты 2, 5 и 8 имеют дефект в одном гене, а мутанты 1, 3, 4, 6 и 7 - в другом гене. В классических экспериментах было показано во многом сходным образом, что есть два r_{II} -гена - r_{IIA} и r_{IIB} .

Б. Как следует из предыдущего ответа (пункт А), если бы вы повторили тест, используя *E. coli* K, инфицированную мутантом 3, то увидели бы такую же картину, как и в тесте, где использовалась *E. coli* K, инфицированная мутантом 1, дефектным по тому же гену.

В. Небольшая фракция фага Т4 дикого типа возникает в смеси мутантов 1 и 5 в результате генетической рекомбинации. Вирусные геномы, растущие в одной клетке, будут рекомбинировать время от времени. Если рекомбинация произойдет между мутантными генами, то может возникнуть геном дикого типа, как показано на рис. 5-55. Поскольку частота рекомбинации почти пропорциональна частоте разделения мутаций, то величину фракции фагов дикого типа при генетических кроссинговерах между мутантами можно точно измерить, чтобы определить порядок и расположение мутаций вдоль хромосомы (что и было осуществлено).

Литература: Crick, F. H.; Brenner, S. The absolute sign of certain phase-shift mutants in bacteriophage T4. J. Mol. Biol. 26, 361-363, 1967.

5-42 Вирус 1 - это типичный вирус с негативным геномом, подобный вирусам гриппа и везикулярного стоматита. Его РНК непосредст-

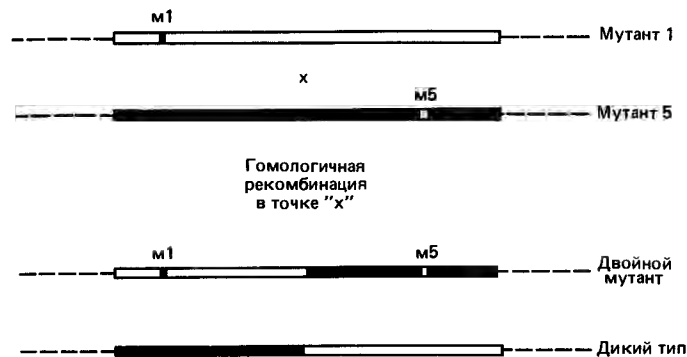


Рис. 5-55. Рекомбинация между двумя мутантами с образованием генома дикого типа (ответ 5-41).

венно не кодирует белки, а вирусная частица содержит РНК-зависимую РНК-полимеразу. В ходе инфекции РНК-зависимая РНК-полимераза использует негативную цепь РНК в качестве матрицы для синтеза позитивной цепи, которая выполняет роль мРНК для вирусных частиц. Позитивные цепи РНК в свою очередь, используются как матрицы для синтеза более крупных геномных (негативных) цепей.

Вirus 2—это типичный вирус с позитивным геномом, подобный полиовирусу. При инфекции он служит в качестве мРНК для вирусных белков, один из которых является репликазой, которая делает с позитивных цепей их копии—негативные цепи, а затем с негативных цепей—геномные (позитивные) цепи.

Вirus 3—это ретровирус, подобный вирусу СПИДа (AIDS). Хотя его РНК может служить в качестве мРНК, однако обычно в ходе инфекции этот путь синтеза белка не используется. Вместо него геномная РНК копируется в ДНК с помощью фермента обратной транскриптазы. ДНК объединяется с хромосомой клетки-хозяина, а затем начинает служить матрицей для образования мРНК с последующим синтезом вирусных белков и геномной РНК—для создания потомства вируса.

5-43 Приведенные результаты указывают на то, что наиболее вероятным предшественником интегрированной формы генома ретровируса является кольцевая ДНК с тандемно расположенными LTR. Картину гибридизации можно понять, обратившись к рис. 5-56. Кольцевая форма с двумя наборами тандемно расположенных

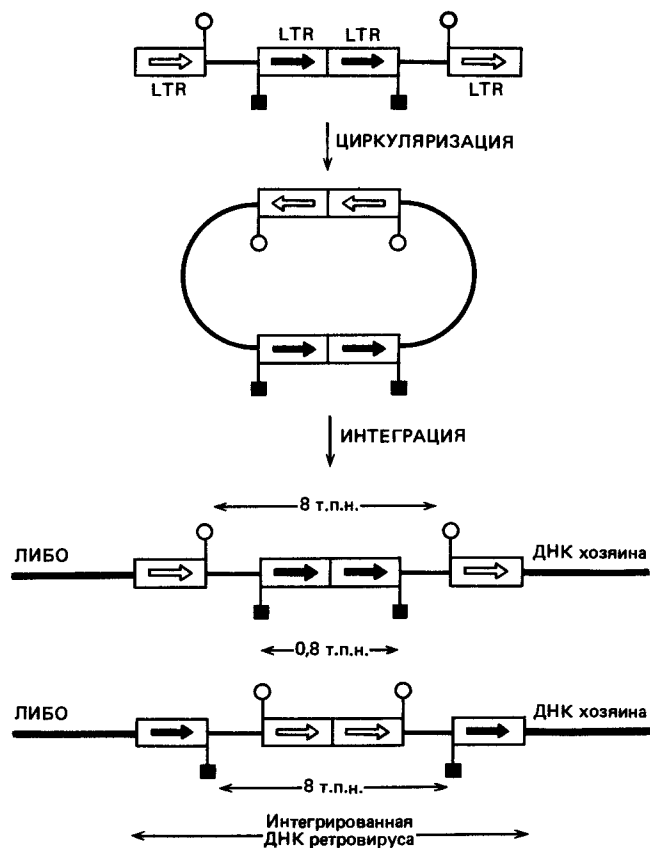


Рис. 5-56. Интеграция генома ретровируса с двумя наборами тандемно расположенных LTR (ответ 5-43).

LTR может встраиваться двумя способами, как показано на этом рисунке. Поскольку в популяции клеток содержатся интегранты обоих типов, то обработка любой рестриктазой приводит к образованию двух фрагментов: 0,8 и 8 т. п. н.

Кольцевая ДНК с одним LTR не может служить предшественником для интеграции, потому что (по аналогии с рис. 5-56) в случае интеграции кольцевых форм с одним LTR обработка рестриктазой должна была бы приводить к образованию еще двух фрагментов: 0,4 и 8 т. п. н.

Недавние эксперименты с использованием различных ретровирусов убедительно показали, что предшественником для интеграции является линейная форма. Причина таких расхождений в выводах пока неясна, она просто может быть обусловлена различиями между ретровирусами.

Литература: Panganiban, A. T.; Temin, H. M. Circles with two tandem LTRs are precursors to integrated retrovirus DNA. *Cell* 36, 673–679, 1984.
Brown, P. O.; Bowerman, B.; Varmus, H. E.; Bishop, J. M. Correct integration of retroviral DNA in vitro. *Cell* 49, 347–356, 1987.
Fujiwara, T.; Mizuuchi, K. Retroviral integration: structure of an integration intermediate. *Cell* 54, 497–504, 1988.

5-44

- А. Все колонии появились только в результате встраивания Tn10 в бактериальный геном, потому что выживание зависит от присутствия гена устойчивости к тетрациклину, переносимого Tn10. Наличие смешанных колоний с синими и белыми секторами — это ключевой результат. Поскольку частота встречаемости секторных колоний высока, а транспозиция — это редкое событие, то секторные колонии должны возникать в основном при единичной транспозиции. В случае репликативного механизма может переноситься только одна цепь родительского гетеродуплекса и, таким образом, могут образовываться только белые или синие колонии в зависимости от того, какая из цепей переносится. При нерепликативном способе, напротив, переносятся обе цепи гетеродуплекса, и в результате репликации и сегрегации в дочерних клетках бактерий они дают начало секторным колониям. (Если исходно бактерии были распределены по поверхности агаровой среды в чашке Петри, то все потомки первоначальной инфицированной клетки, оставаясь в непосредственном контакте друг с другом, образуют колонию. Если при первом делении образуются две разные дочерние клетки, то их потомки размножаются рядом, создавая единую колонию, но с секторами, образуемыми двумя вариантами бактерий.) Чисто синие и чисто белые колонии возникают в результате транспозиций, в которых участвуют гомодуплексы. Количественное соотношение синих, белых и секторных колоний определяется тем, что гетеродуплексы (дающие начало секторным колониям) и гомодуплексы (дающие начало колониям одного цвета) содержались в смеси в равных количествах.
- Б. Каждый гетеродуплекс содержит область ДНК с неправильным спариванием, соответствующую положению мутации в *lacZ*-гене. Если эти гетеродуплексы ввести в бактерии, которые могут репарировать такие неправильные спаривания, то частота появления секторных колоний будет ниже, чем в описанном опыте. По существу каждый акт репаративного восстановления должен превращать гетеродуплекс в гомодуплекс. Если репарация неправильного спаривания оснований будет спонтанной, ненаправленной, то ча-

стота появления синих и белых колоний должна возрасти одинаково.

- В. Если бы вы использовали интегрируемую форму фагового генома, то выжившие колонии могли бы образоваться в результате сайт-специфической рекомбинации, которая происходит чаще, чем транспозиция. При сайт-специфической рекомбинации обе цепи фагового генома встраиваются (как описано в МБК, см., в частности, рис. 5-67). Таким образом, доля синих, белых и секторных колоний была бы такой же, как в случае нерепликативной транспозиции. Действительно, в реальных исследованиях, проведенных для выяснения механизма транспозиции Tn10, в качестве положительного контроля использовали интегрируемую (но нереплицирующуюся) форму бактериофага лямбда. В обоих экспериментах были получены одинаковые результаты.

Литература: *Bender, J.; Kleckner, N. Genetic evidence that Tn10 transposes by a nonreplicative mechanism. Cell 45, 801–815, 1986.*

5-45

- А. Поскольку у бактериофага фХ174 есть только одна мРНК, то все четыре его гена должны быть закодированы в этой РНК. При синтезе белка рибосома движется вдоль мРНК в направлении от 5'-к 3'-концу, поэтому все четыре гена транслируются, как указано на рис. 5-37, слева направо.
- Б. Гены А, В и К должны транслироваться в разных рамках считывания, т.к. стоп-кодон в конце гена В обходится при синтезе А и К, а стоп-кодон в конце гена А обходится при синтезе К. Аналогичным образом гены А, К и С тоже транслируются в разных рамках считывания. Имеются только три отдельные рамки считывания (поскольку каждый кодон состоит из трех нуклеотидов), поэтому гены В и С должны транслироваться в одной и той же рамке считывания.
- В. Как показано на рис. 5-57, мутационные изменения в генах К и В связаны с заменой кодона треонина (ACA) на кодон аргинина (AGA) в гене А. Ген С при этом не изменяется.

Литература: *Sanger, F. et al. The nucleotide sequence of bacteriophage фХ174. J. Mol. Biol. 125, 225–246, 1978.*

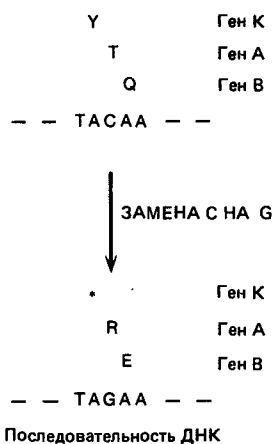


Рис. 5-57. Множественные мутационные изменения, вызываемые изменением единственного основания в области перекрытия генов (ответ 5-45).

Клонирование ДНК и генная инженерия

5-46

- А. рестрицирующие нуклеазы; рестриктонные фрагменты (рестрикты)
- Б. векторы клонирования
- В. клон
- Г. клон геномной ДНК; библиотека геномной ДНК
- Д. библиотека кДНК
- Е. субтрактивная гибридизация
- Ж. «прогулка по хромосоме»
- З. гибридизационная селекция
- И. экспрессирующие
- К. комбинированный белок
- Л. трансгенные
- М. полимеразная цепная реакция

5-47

- А. Правильно. (Например, рестрицирующая нуклеаза SmaI разрезает

последовательность GGGCCC и комплементарную ей область другой цепи точно посередине, в результате чего образуются рестрикционные фрагменты с «липкими» или «тупыми» концами.)

- Б. Правильно.
- В. Правильно.
- Г. Неправильно. Из-за присутствия интронов в геномных клонах по ним почти невозможно определить аминокислотную последовательность кодируемых белков. Поскольку при синтезе мРНК интроны удаляются, аминокислотную последовательность можно установить с помощью клонов кДНК.
- Д. Неправильно. Антитела должны быть направлены против белка, кодируемого данной мРНК.
- Е. Правильно.
- Ж. Неправильно. Эукариотический геномный клон, вероятно, содержит интроны, которые будут мешать правильной экспрессии белка в клетках бактерий.
- З. Неправильно. Трансгенные животные образуются за счет включения ДНК в хромосомы клеток зародышевой линии, благодаря чему чужеродная ДНК присутствует в последующих поколениях организма.

5-48

- А. 5'- и 3'-концы разрезанных молекул показаны на рис. 5-58. Последовательности ДНК обычно представляют таким образом, что 5'-конец верхней цепи находится слева.
- Б. Как показано на рис. 5-58, концы, образующиеся при обработке BamHI, могут быть достроены ДНК-полимеразой, а концы, образующиеся при обработке PstI, — нет. Это различие объясняется известным свойством ДНК-полимеразы: для ее работы необходимы праймер с 3'-ОН-концом, к которому могут присоединяться дезоксинуклеозидтрифосфаты, и матричная цепь, определяющая, какой нуклеотид должен присоединиться. Эти требования выпол-

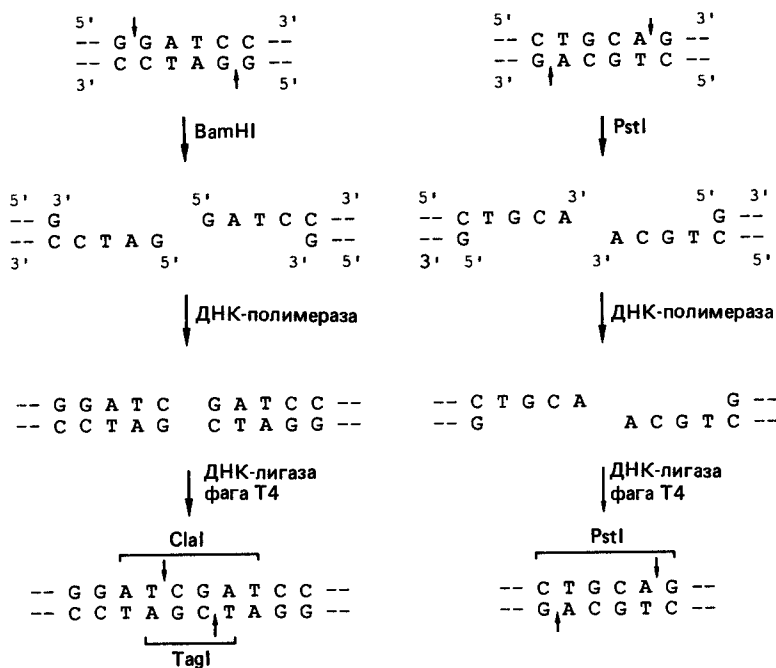


Рис. 5-58. Расщепление, модификация и сшивание ДНК, содержащей BamHI-сайт или PstI-сайт (ответ 5-48).

няются в случае BamHI-концов, но не в случае концов, образуемых рестриктазой PstI, которая разрезает дальше от 5'-конца, в результате чего фрагменты не достраиваются ДНК-полимеразой, так как 5'-конец не может служить затравкой.

Примечание: обычно в методе рекомбинантной ДНК используется ДНК-полимераза фага Т4, чтобы «затупить» концы обоих типов. Концы BamHI будут «затупляться» в результате пришивания к ним соответствующих нуклеотидов, как показано на рис. 5-58. Однако PstI-концы также будут затупляться благодаря ассоциированной 3' → 5'-экзонуклеазной активности, которая удаляет участок у 3'-конца, оставляя тупой конец.

- В. Как видно на рис. 5-58, затупленные концы в случае BamHI и немодифицированные концы в случае PstI могут соединяться ДНК-лигазой фага Т4.
- Г. Соединение обработанных концов приводит к восстановлению PstI-сайта, но не BamHI-сайта. За счет соединения достроенных концов в случае BamHI образуются два новых рестрикционных сайта, как указано на рис. 5-58. Расщепление, достраивание на концах и соединение концов заново часто приводят к появлению новых рестрикционных сайтов, которые иногда полезны для дальнейших манипуляций с ДНК.

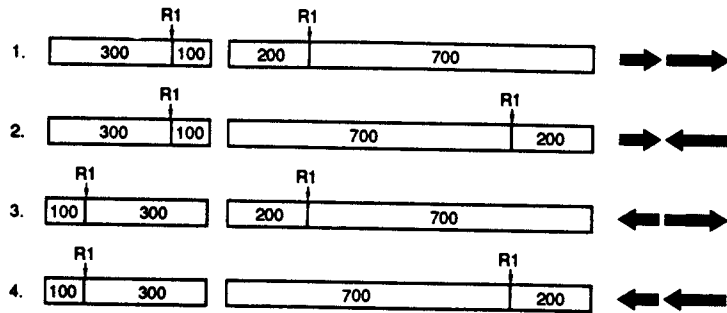
5-49

- А. Четыре центральных нуклеотида в сайте, узнаваемом BamHI, образуют сайт, узнаваемый Sau3A. Поскольку Sau3A узнает только эти четыре нуклеотида, все BamHI-сайты будут разрезаться ферментом Sau3A. Обратного, однако, не может быть, потому что BamHI узнает сайт, состоящий из шести нуклеотидов. Таким образом, BamHI будет разрезать только часть сайтов, узнаваемых Sau3A, у которых есть соответствующие соседние нуклеотиды (т. е. 5'G и 3'C). Поскольку в среднем один из четырех соседних нуклеотидов на каждой стороне окажется правильным, то лишь одно из 16 возможных расположений двух пограничных нуклеотидов будет подходящим для того, чтобы сайт расщеплялся BamHI. Таким образом, только 1 из 16 сайтов, узнаваемых Sau3A, будет разрезаться BamHI.
- Б. Поскольку для Sau3A, как уже было отмечено, не имеют значения пограничные нуклеотиды, все гибридные сайты Sau3A/BamHI могут разрезаться с помощью Sau3A. Однако с помощью BamHI будет разрезаться в среднем только один из четырех гибридных сайтов. В гибридном сайте пять из шести нуклеотидов будут соответствовать BamHI-сайту; шестой нуклеотид окажется правильным примерно в одном из четырех гибридных сайтов.
- В. Вероятность того, что любая четырехнуклеотидная последовательность окажется Sau3A-сайтом, равна $(1/4)^4$, или 1 из 256, в выбранной случайным образом последовательности ДНК, где все четыре нуклеотида встречаются с одинаковой частотой. Таким образом, сайт, узнаваемый Sau3A, будет встречаться в среднем один раз на 256 п. н. в цепи ДНК. Сайт, узнаваемый BamHI и состоящий из шести нуклеотидных пар, будет встречаться один раз на 4096 п. н. $((1/4)^6 = 4096)$ в случайной последовательности ДНК.

5-50

- А. Сложность набора фрагментов после сшивания объясняется тем, что соединяться могут любые два BamHI-конца. Таким образом, при соединении фрагментов длиной 0,4 т. п. н. может создаваться целый набор фрагментов с размерами 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 т. п. н. и т. д.

Рис. 5-59. Различные положения фрагментов 0,4 и 0,9 т. п. н., полученных путем обработки BamHI, при образовании фрагмента 1,3 т. п. н. (ответ 5-50).



Подобно этому, фрагменты длиной 0,9 т. п. н. будут соединяться с образованием набора следующих фрагментов: 1,8; 2,7; 3,6 т. п. н. и др. И наконец, комбинации двух фрагментов дадут третий набор фрагментов с размерами 1,3; 1,7; 2,1; 2,2 т. п. н. и т. д. (Наблюдаемая картина распределения часто еще более сложна, так как эти фрагменты при соединении их концов могут образовывать кольцевые структуры.)

Б. Поскольку два любых BamHI-конца способны соединяться между собой, то могут возникнуть одинаковые по размеру, но различающиеся по структуре фрагменты, как показано на рис. 5-59 для фрагмента размером 1,3 т. п. н. Обработка популяции фрагментов размером 1,3 т. п. н. рестриктазой EcoRI приводит к образованию разнообразных фрагментов с размерами от 0,1 т. п. н. (см. левые концы структур 3 и 4, рис. 5-59) до 1,0 т. п. н. (см. внутренние фрагменты структуры 4, рис. 5-59).

5-51 Принцип, на котором основан метод построения рестрикционных карт, очень похож на тот, который используется при химическом секвенировании ДНК. В обоих случаях молекулы метят на одном конце, затем частично фрагментируют с помощью неполного расщепления в нескольких специфических сайтах и, наконец, распределяют фрагменты по размерам. Длина меченого фрагмента указывает на расстояние от меченого конца до сайта, по которому произошло расщепление.

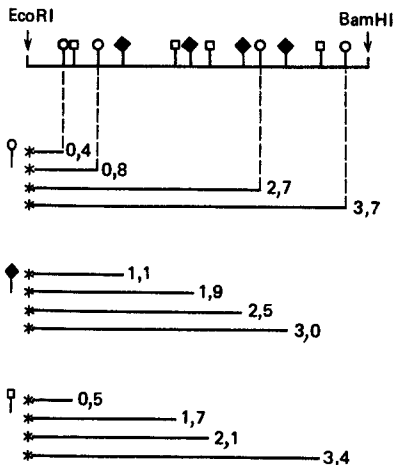


Рис. 5-60. Карта рестрикции клонированного вами сегмента ДНК и продукты частичного расщепления, по которым она составлена (ответ 5-50). Числа рядом с фрагментами означают их длину, определение которой проиллюстрировано на рис. 5-42.

Рестрикционная карта, полученная на основе радиоавтограммы, изображенной на рис. 5-42, представлена на рис. 5-60, где она сопоставляется с продуктами неполного расщепления, производимого одной рестриктазой (см. штриховые линии). Размеры рестриктов оценивают путем сравнения с набором маркерных фрагментов на рис. 5-42. (Из рисунка видно, что расстояние, на которое мигрируют эти фрагменты при электрофорезе, связано с их размерами нелинейно, чем могут объясняться различия между вашими оценками и оценками, представленными на рис. 5-60.)

5-52 На рис. 5-61 показаны два участка полученного вашим коллегой белка, характеризующиеся наименьшей многозначностью, и соответствующие этим участкам олигонуклеотидные зонды. Кодоны приведены под последовательностью аминокислот в форме РНК, чтобы легче было перейти к генетическому коду. Олигонуклеотиды показаны в виде последовательностей ДНК, т.е. в том виде, в каком они будут синтезированы. (Комплементарные им последовательности тоже могут служить хорошими зондами.)

Синтез олигонуклеотидов производят путем последовательного присоединения нуклеотидов, так что за один тщательно контролируемый цикл химических реакций присоединяется один нуклео-

Липидный бислой

6-1

- А. липидный бислой
- Б. фосфолипиды; холестерол; гликолипиды
- В. амфипатические
- Г. полярная; гидрофобные углеводородные (жирные кислоты)
- Д. мицеллы; бислойные пленки
- Е. липосомы; черные (черными мембраны называют потому, что взаимопогасящая интерференция света, отраженного от двух поверхностей, делает их как бы черными; мыльные пузыри при белом освещении показывают интерференционные цвета, зависящие от толщины пленки)
- Ж. спиновая метка
- З. фазовый переход
- И. гликолипиды
- К. галактоцереброзид; миелиновая
- Л. ганглиозиды, G_{M1}

6-2

- А. Правильно.
- Б. Неправильно. Липидные бислои – термодинамически стабильные структуры. Энергия исходно необходима для образования различных липидов, но для поддержания бислойного расположения этих липидов в мембране никакой дополнительной энергии не требуется.
- В. Правильно.
- Г. Неправильно. Текучесть мембраны существенно зависит также от длины боковых цепей жирных кислот и числа содержащихся в них *цис*-двойных связей.
- Д. Правильно.
- Е. Неправильно. Для мутантных клеток, которые не могут синтезировать холестерол, необходимо его присутствие в культуральной среде. В отсутствие холестерола их мембраны быстро разрушаются.
- Ж. Неправильно. Холиновая группа головы действительно заряжена положительно, но она связана с остальной частью липида фосфодиэфирной связью, а фосфатная группа несет при физиологических значениях рН отрицательный заряд. Следовательно, фосфатидилхолин не несет чистого заряда.
- З. Правильно.
- И. Правильно. (Гликолипиды синтезируются в полости аппарата Гольджи и не могут преодолевать мембрану по механизму транс-

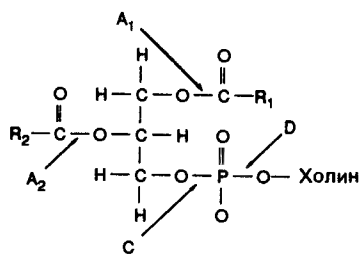


Рис. 6-15. Специфическое расщепление несколькими фосфолипазами (ответ 6-4). Чувствительные связи указаны стрелками. Специфические фосфолипазы обозначены буквами: A_1 – фосфолипаза A_1 ; A_2 – фосфолипаза A_2 ; C – фосфолипаза C; D – фосфолипаза D.

локации. Ферменты, присоединяющие углеводы к липидам, в цитоплазме в свободном состоянии не обнаружены.)

- 6-3 Каждую микроворсинку можно представить в виде цилиндра диаметром 0,1 мкм и высотой 1,0 мкм. По отношению площади боковой поверхности цилиндра, который представляет собой новую мембрану (относительно ровной мембраны, над которой микроворсинки возвышаются), к площади сечения цилиндра (эквивалентной площади плазматической мембраны, у которой нет выступающих над ее поверхностью микроворсинок), можно оценить увеличение площади поверхности за счет одной микроворсинки. Площадь боковой поверхности цилиндра ($2\pi rh$, где r – радиус, а h – высота цилиндра), равна 0,31 мкм², площадь поперечного сечения цилиндра (πr^2) равна 0,0079 мкм². Таким образом, увеличение площади поверхности за счет одной микроворсинки равно 0,31 мкм²/0,0079 мкм², т. е. 40. Однако эта величина дает завышенную оценку приращения поверхности плазматической мембраны за счет ворсинок, так как последние располагаются лишь на части этой поверхности. Долю поверхности плазматической мембраны, занятой микроворсинками, можно оценить по поперечному сечению, представленному на рис. 6-1. По приблизительным подсчетам лишь около половины поверхности плазматической мембраны покрыто микроворсинками. Они, таким образом, увеличивают площадь контакта клетки со средой во внутреннем пространстве кишки примерно в 40/2 раз, т. е. в 20 раз.

6-4

- А. Фосфолипаза расщепляет фосфатидилхолин на фосфорилхолин и диацилглицерол, разрушая эфирную связь, которая соединяет фосфатную группу с глицеролом. Эта фосфолипаза по своей специфичности подобна фосфолипазе C (рис. 6-15). На этом же рисунке представлен ряд других типов фосфолипаз: фосфолипазы A_1 и A_2 , которые отщепляют цепи жирных кислот, находящихся в определенных положениях, и фосфолипаза D, которая отщепляет одну группу – полярную голову, но не затрагивает связь фосфатной группы с глицеролом. Эти ферменты чрезвычайно полезны для анализа липидов. Некоторые из них выделяют из ядов змей.
- Б. Для вас может быть неожиданным, что удаление гидрофильной полярной головы из фосфатидилхолина вызывает полное разрушение мембраны эритроцитов, тогда как удаление внешних остатков сиаловых кислот или расположенных снаружи доменов белков не приводит к такому эффекту. Ведь половина массы мембраны приходится на белки, а фосфатидилхолин составляет менее половины массы наружного липидного монослоя бислойной плазматической мембраны. Этот результат свидетельствует о том, что липидный бислой определяет целостность мембраны, причем гидрофильные полярные группы играют наиболее существенную роль в образовании стабильной бислойной структуры. (Кстати, не все ферменты типа фосфолипазы C вызывают гемолиз. Некоторые из них не действуют на фосфолипиды в интактных мембранах главным образом потому, что чувствительные к их действию связи пространственно недоступны.)

6-5

- А. Только фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин содержат аминогруппы, которые могут взаимодействовать с SITS. Поскольку эти фосфолипиды могут быть помечены только после того, как

эритроциты станут проницаемыми (в процессе превращения в «тени»), они, по-видимому, располагаются во внутреннем монослое. Это заключение подтверждается результатами опытов со змеиным ядом, который разрушает фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин только в тенях. Все это показывает, что данные фосфолипиды локализованы почти исключительно во внутреннем монослое мембраны эритроцитов.

Разрушение фосфатидилхолина и сфингомиелина фосфолипазой в живых, неповрежденных клетках свидетельствует о том, что эти два фосфолипида размещаются в наружном монослое. Это справедливо, если эритроциты действительно остаются интактными при такой ферментативной обработке. В этих опытах по использованию змеиного яда отсутствие деградации фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина в интактных клетках служит внутренним контролем. В отношении эффекта сфингомиелиназы внутреннего контроля нет, но отсутствие лизиса клеток указывает на то, что мембрана остается неповрежденной.

Результаты, приведенные в табл. 6-2, не исключают возможности того, что фосфатидилхолин и сфингомиелин локализованы во внутреннем монослое. Однако судя по количеству сфингомиелина, расщепленного сфингомиелиназой, почти весь сфингомиелин находится в наружном монослое мембраны. Для фосфатидилхолина таких данных нет, таким образом, было бы неправильно считать, что фосфатидилхолин локализован исключительно в наружном монослое.

- Б. Вы выбираете эритроциты для этих экспериментов, поскольку в них нет внутренних мембран. Если бы такие опыты проводились на клетках, у которых есть внутренние мембраны, то нельзя было бы непосредственно определить фосфолипидный состав внутреннего монослоя, поскольку фосфолипиды внутренних мембран могут оказать маскирующее влияние.

Литература: Bretscher, M. Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nature New Biol.* 236: 11-12, 1972.

Deenen, L. L. M., DeGier, J. Lipids of the red cell membrane. In *The Red Blood Cell* (D. MacN. Surgenor, ed.), pp. 147-211, Academic Press, New York, 1974.

6-6

- А. Разница в скоростях снижения величины сигнала ЭПР — это результат различия в расположении нитроксильного радикала в двух фосфолипидах. В фосфолипиде 1 нитроксильный радикал находится на его полярной голове и, следовательно, в непосредственном контакте с внешней средой. Таким образом, он может легко и быстро взаимодействовать с аскорбиновой кислотой. В фосфолипиде 2 нитроксильный радикал присоединен к цепи жирной кислоты и поэтому частично замаскирован в глубине мембраны. Вследствие этого он менее доступен для действия аскорбиновой кислоты и восстанавливается медленнее.
- Б. Ключевой результат состоит в том, что степень снижения величины сигнала ЭПР в присутствии и в отсутствие аскорбиновой кислоты в опытах с вновь замкнутыми тенями эритроцитов одна и та же, а в опытах с неповрежденными эритроцитами — нет. Из этого следует, что в цитоплазме эритроцитов есть некий восстанавливающий агент, который восстанавливает более доступный фосфолипид 1, но не может восстановить менее доступный фосфолипид 2. Поэтому в интактных эритроцитах фосфолипид 2 стабилен в отсутствие аскорбиновой кислоты, а в ее присутствии спин-меченые фосфолипиды в наружном монослое восстанавливаются, что

приводит к потере половины сигнала ЭПР. С другой стороны, фосфолипид 1 не стабилен в интактных эритроцитах в отсутствие аскорбиновой кислоты, потому что фосфолипиды во внутреннем монослое доступны действию восстанавливающего цитоплазматического агента, который снижает сигнал ЭПР наполовину. При добавлении аскорбиновой кислоты меченые фосфолипиды в наружном монослое также восстанавливаются, вызывая потерю остального сигнала ЭПР.

- В. Результаты, представленные на рис. 6-3, позволяют заключить, что меченые фосфолипиды были введены в оба монослоя плазматической мембраны эритроцитов в равных количествах. Фосфолипид 2 был на 50% чувствителен (доступен) к действию аскорбиновой кислоты, что указывает на присутствие половины метки в наружном монослое, и на 50% нечувствителен, т.е. другая половина метки, не подверженная действию аскорбиновой кислоты, находилась во внутреннем монослое. Количество фосфолипида 1, чувствительного к цитоплазматическому восстанавливающему агенту, составляло 50% от его общего количества, следовательно, половина метки находилась во внутреннем монослое. Остальная половина молекул фосфолипида 1 была доступна действию аскорбиновой кислоты, следовательно, половина метки находилась в наружном монослое мембраны.

Литература: *Rousselet, A., Guthmann, C., Matricon, J., Bienvenue, A., Devaux, P. F.* Study of the transverse diffusion of spin labeled phospholipids in biological membranes: I. Human red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* 426: 357-371, 1976.

6-7

- А. По данным этих экспериментов можно оценить полупериод транслокации, если экстраполировать кривую на рис. 6-4 до точки, в которой сигнал ЭПР снижается на 50%. Для клеток, меченных по внутреннему монослою, эти данные дают величину полупериода транслокации около 7 ч. У клеток, меченных по наружному монослою, полупериод транслокации гораздо больше, но точность его оценки сомнительна. Эти данные показывают, что частота перескоков фосфолипидов между двумя монослоями плазматической мембраны эритроцита чрезвычайно низка. В экспериментах с искусственными бислоями были получены еще большие полупериоды; действительно, в самых удачных экспериментах, когда были приняты максимальные предосторожности против окисления или иных повреждений липидов, частота перескоков была неизмеримо более низкой (реже одного раза в месяц).
- Б. Фосфолипид 2 был использован для мечения внутреннего монослоя, а фосфолипид 1 — для мечения наружного монослоя. Как следует из рис. 6-3, В, фосфолипид 2 во внутреннем монослое не восстанавливается цитоплазмой эритроцитов, а в наружном монослое может быть восстановлен аскорбатом. Таким образом, фосфолипид 2 пригоден для измерения скорости транслокации от внутреннего монослоя к наружному. Как следует из результатов, приведенных на рис. 6-3, А, фосфолипид 1 во внутреннем монослое восстанавливается цитоплазмой эритроцита, но, находясь в наружном монослое, он стабилен в отсутствие аскорбата. Таким образом, фосфолипид 1 пригоден для измерения скорости транслокации от наружного монослоя к внутреннему.
- В. Можно получить интактные эритроциты, содержащие спин-меченые фосфолипиды исключительно во внутреннем монослое. Процедура заключается во введении фосфолипида 2 в мембрану

эритроцитов и последующей инкубации в течение часа в присутствии аскорбата. Последний восстанавливает липид в наружном монослое, не затрагивая меченый липид, попавший во внутренний монослой мембраны эритроцитов. Подобным же образом спин-меченый фосфолипид 1 можно ввести исключительно в наружный монослой: мембрана эритроцитов метится этим фосфолипидом, затем клетки инкубируют 15 мин в среде без аскорбата. При этом спин-меченый фосфолипид 1 во внутреннем монослое восстанавливается соединениями, присутствующими в цитоплазме, и метка остается только в наружном монослое.

Литература: *Rousselet, A., Guthmann, C., Matricon, J., Bienvenue, A., Devaux, P. F.* Study of the transverse diffusion of spin labeled phospholipids in biological membranes: I. Human red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* 426: 357–371, 1976.

Мембранные белки

6-8

- А. трансмембранные
- Б. периферические мембранные; интегральные мембранные
- В. детергенты
- Г. денатурируют
- Д. векторное мечение
- Е. спектрин
- Ж. белок полосы 3
- З. замораживание–скалывание; Р-поверхность; Е-поверхность
- И. бактериородопсин
- К. фотосинтетический реакционный центр
- Л. вращательная; латеральная; перескок (флип-флоп), или транслокация
- М. гетерокарионы
- Н. восстановление флуоресценции после фотовыцветания

6-9

- А. Правильно.
- Б. Неправильно. Одно время считалось, что это точное описание биологических мембран, но, как теперь очевидно, многие мембранные белки погружены непосредственно в бислой.
- В. Неправильно. Более вероятно, что трансмембранные сегменты таких белков представляют собой α -спираль. При α -спиральной структуре образуются все возможные водородные связи между группами атомов, удаленными друг от друга вдоль полипептидной цепи, тогда как в β -складчатом слое около половины возможных водородных связей совсем не образуется (см. МБК, рис. 3-25 и 3-26).
- Г. Правильно.
- Д. Неправильно. Эритроциты человека не имеют внутренних мембран; на ранних стадиях своего развития эти клетки утрачивают ядра.
- Е. Правильно.
- Ж. Правильно.
- З. Правильно.
- И. Правильно.
- К. Неправильно. Апикальные и базолатеральные поверхности эпителиальных клеток, соединенных между собой плотными контактами, различаются по составу липидов.

6-10 До сих пор в биологических мембранах обнаружено только связывание белков по типу А, Б, Г, Д и И. Типа В, при котором углевод расположен на цитоплазматической стороне мембраны, по-видимому, не существует. Встраивания по типу Ж и З, когда белки погружены либо полностью, либо только своими концами, не обнаружено, и с теоретической точки зрения оно маловероятно.

6-11

- А. Последовательность А – реальный пронизывающий мембрану сегмент молекулы гликофорина, трансмембранного белка эритроцитов. Это преимущественно неполярный сегмент, хотя в нем содержатся незаряженные полярные остатки треонина (Т) и серина (S), которые являются довольно обычными компонентами белковых сегментов, пронизывающих плазматическую мембрану.
- Б. Последовательность Б вряд ли является сегментом белка, пронизывающим мембрану, потому что в ней содержатся три остатка пролина (Р), которые нарушали бы α -спиральную структуру, из-за чего группы, образующие водородные связи, оказывались бы открытыми в неполярном окружении внутри липидного бислоя.
- В. Последовательность В также не может быть трансмембранным сегментом, потому что она содержит три заряженных остатка – глутаминовую кислоту (Е), аргинин (R) и аспарагиновую кислоту (D), присутствие которых в неполярном липидном бислое будет энергетически невыгодным.

6-12

- А. Отсутствие окраски на сиаловую кислоту после обработки сиалидазой указывает на то, что этот углевод экспонирован на поверхности. Он присоединен к гликофору, следовательно, гликофорин также выступает на наружную поверхность. Этот вывод подтверждается результатами гидролиза полипептидной цепи проназой, в результате которого окрашивания реактивом Шиффа не происходит. Результаты обработки проназой показывают, что и белок полосы 3 также выступает на поверхность клетки. В этом случае появление новой белковой полосы с молекулярной массой около 70 000 дальтон позволяет сказать, что фрагмент белка полосы 3 с молекулярной массой около 30 000 дальтон экспонирован на поверхности. Ни в том, ни в другом случае ферментативного гидролиза обе полосы спектрина не были затронуты, что свидетельствует об отсутствии спектрина на наружной поверхности мембраны.
- Б. Один из вариантов экспериментальной проверки возражения вашей коллеги состоит в том, чтобы разрушить незамкнутые тени эритроцитов до того, как они будут подвергнуты обработке проназой. Если спектрин устойчив к действию проназы, его подвижность при электрофорезе в полиакриламидном геле в присутствии детергента, додецилсульфата натрия, не должна измениться. Если, однако, спектрин локализован на цитоплазматической поверхности мембраны и расщепляется проназой, его подвижность должна значительно измениться. Эти контрольные эксперименты были проделаны и показали, что спектрин чувствителен к проназе.

Другая возможная проверка состоит в том, чтобы получить вывернутые наизнанку тени эритроцитов и попытаться, если это возможно, отделить спектрин от мембран, не нарушая целостности последних. Этот подход был тоже успешно осуществлен; полученные результаты подтвердили, что спектрин находится на внутренней,

цитоплазматической поверхности клеточной мембраны и не погружен целиком в мембрану.

- В. Для того чтобы при помощи этого основного экспериментального подхода определить, какие из белков эритроцитов пронизывают мембрану, необходимо приготовить вывернутые наизнанку пузырьки. Это можно сделать путем гомогенизации теней эритроцитов. В среде определенного ионного состава образовавшиеся мембранные фрагменты замыкаются. Если вывернутые пузырьки обработать проназой, то подвижность белков полосы 3 и гликофорина меняется. Эти результаты вместе с другими, приведенными выше, указывают на то, что белок полосы 3 и гликофорин выступают на поверхность мембраны эритроцитов с обеих ее сторон, внутренней и наружной, следовательно, они должны быть трансмембранными белками.

Литература: Bennett, V., Stenbuck, P. J. The membrane attachment protein for spectrin is associated with band 3 in human erythrocyte membranes. *Nature* 280:468-473, 1979.

Bennett, V., Stenbuck, P. J. Association between ankyrin and the cytoplasmic domain of band 3 isolated from the human erythrocyte membrane. *J. Biol. Chem.* 255:6424-6432, 1980.

6-13

- А. Спектрин = 3×10^5 молекул/клетку
Белок полосы 3 = 9×10^5 молекул/клетку
Гликофорин = $2,3 \times 10^5$ молекул/клетку

Расчет числа молекул спектрина на один эритроцит делается следующим образом. Сначала рассчитывают долю от общего белка, которая приходится на спектрин, а затем переводят это число в число молекул спектрина, используя известную молекулярную массу спектрина и число Авогадро:

$$\frac{\text{спектрин}}{\text{клетка}} = \frac{5 \text{ мг белка}}{10^{10} \text{ клеток}} \times \frac{0,25 \text{ спектрин}}{\text{общий белок}} \times \frac{\text{ммоль спектрина}}{250\,000 \text{ мг}} \times \frac{6 \times 10^{20} \text{ молекул}}{\text{ммоль спектрина}} = 3 \times 10^5 \text{ молекул.}$$

Рассчитанное число молекул гликофорина на клетку является слишком низким (в 2,5 раза ниже, чем истинное), потому что 60% молекулярной массы гликофорина приходится на углеводную часть, которая не окрашивается белковым красителем Кумасси синим.

- Б. Доля поверхности плазматической мембраны, занимаемой белком полосы 3, равняется площади поперечного сечения молекулы этого белка (πr^2), умноженной на общее число молекул белка полосы 3 (9×10^5) и деленной на общую площадь поверхности эритроцита (10^8 нм^2). Заметьте, что длина молекулы в расчет не входит.

$$\frac{\text{белок полосы 3}}{\text{плазматическая мембрана}} = \frac{3,14 \times (3 \text{ нм})^2}{\text{молекула}} \times \frac{9 \times 10^5 \text{ молекул}}{\text{клетка}} \times \frac{1 \text{ клетка}}{10^8 \text{ нм}^2} = 0,25.$$

Таким образом, белок полосы 3 занимает около четверти поверхности эритроцита. Этот до некоторой степени удивительный результат согласуется с данными электронной микроскопии, полу-

ченными методом замораживания-скальвания. На фотомикрографиях хорошо видны электроноплотные внутримембранные частицы, которые, как считают, представляют собой димеры белка полосы 3 (см. МБК, рис. 6-28).

- 6-14** Присутствие обоих белков на дне пробирки, как указано для смесей 3, 4 и 6 в табл. 6-4, свидетельствует о взаимодействии между этими белками. Судя по результатам опытов с двойными смесями, четыре указанных белка, возможно, соединены в такой последовательности: белок полосы 3-анкирин-спектрин-актин. В МБК (см. рис. 6-26) графически изображены связи этих молекул в образуемой ими сети цитоскелета на цитоплазматической стороне мембраны эритроцитов. В действительности взаимодействие между актином и спектрином слишком слабое, чтобы его можно было определить таким образом, если только не будет добавлен третий белок-белок полосы 4,1.

6-15

- А. Скорости диффузии, приведенные в этой задаче, позволяют рассчитать следующие соотношения концентраций:

$$\begin{aligned} \text{при } 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с} \quad (C_A/C_B) &= 0,51, \\ \text{при } 10^{-9} \text{ см}^2/\text{с} \quad (C_A/C_B) &= 0,0013, \\ \text{при } 10^{-10} \text{ см}^2/\text{с} \quad (C_A/C_B) &= 1,1 \times 10^{-29}. \end{aligned}$$

Подробно расчет такого отношения для скорости диффузии $10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$ выглядит следующим образом:

$$\begin{aligned} C_A/C_B &= \exp \left[- \left(1 \frac{\text{мкМ}}{\text{мин}} \times 40 \text{ мкМ} \times \frac{\text{с}}{10^{-8} \text{ см}^2} \times \frac{1 \text{ мин}}{60 \text{ с}} \times \right. \right. \\ &\quad \left. \left. \times \frac{1 \text{ см}^2}{10^8 \text{ мкМ}^2} \right) \right] = 0,51. \end{aligned}$$

Таким образом, скорость диффузии $10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$ достаточна, чтобы сохранить почти равномерное распределение мембранного белка, тогда как более низкие скорости не приводят к такому эффекту. При подобных расчетах используются определенные допущения, которые могут быть подвергнуты сомнению, тем не менее на основе этих расчетов можно ставить вопросы относительно того, с какой точностью разные экспериментальные методы позволяют измерять скорости диффузии белков. Эти нерешенные пока вопросы служат источником разногласий в данной области, их разрешение даст ценную информацию по вопросу о динамике мембран.

- Б. Исходя из приведенных выше расчетов, можно вполне обоснованно предсказать, что мембранные белки, соединенные за счет поперечных сшивок в крупные агрегаты, должны иметь низкие скорости диффузии и располагаться в каком-нибудь одном участке поверхности клетки. Именно это и наблюдается. Если для образования поперечных сшивок были использованы флуоресцентно меченные антитела, то агрегаты сначала определяются как пятна на клеточной поверхности (пэтчи). Со временем эти участки собираются на одном полюсе клетки, образуя структуру, называемую «колпачком».

Литература: Bretscher, M. S. Endocytosis: relation to capping and cell locomotion. Science 224:681-686, 1984.

Мембранные углеводы

6-16

- А. гликопротеины; гликолипиды; протеогликаны
- Б. N-связанные; O-связанные
- В. лектины
- Г. клеточная оболочка; гликокаликс

6-17

- А. Правильно.
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. Справедливо прямо противоположное.
- Г. Правильно.
- Д. Неправильно. Во внутренних мембранах углеводы обращены внутрь компартмента, ограниченного мембраной.
- Е. Неправильно. Хотя молекулы углевода в основном присоединены к интегральным белкам мембраны, в гликокаликсе также могут содержаться адсорбированные гликопротеины и протеогликаны.

6-18

Предложение вашего коллеги основывается на важном различии между нормальными и вывернутыми наизнанку мембранными везикулами. Нормальные везикулы несут на своей внешней, обращенной к среде поверхности углеводы, поэтому при аффинной хроматографии они будут задерживаться в аффинной колонке, содержащей лектин. Вывернутые наизнанку везикулы, наоборот, не имеют углеводов на своей внешней поверхности, так что они будут проходить через такую колонку совершенно свободно.

6-19

- А. Цитохалазин В конкурентно ингибирует транспорт глюкозы, поскольку он, по-видимому, присоединяется к участку связывания D-глюкозы или вблизи него. Если D-глюкоза присутствует в избытке, то участок связывания на переносчике занят D-глюкозой, что препятствует присоединению к нему цитохалазина и влияет тем самым на образование перекрестных связей. С другой стороны, L-глюкоза не влияет на связывание цитохалазина В с переносчиком, поскольку она не взаимодействует с последним.
- Б. Поскольку обработка нативного переносчика глюкозы ферментом, отщепляющим боковые олигосахаридные цепи, приводит к получению более четкой электрофоретической полосы, размытый характер ее должен быть обусловлен гетерогенностью углеводных компонентов, связанных с белком. Объясняется ли эта гетерогенность различной заполненностью участков на поверхности белка, способных к O- или N-связыванию олигосахаридов, либо связана с вариативностью длины или последовательности боковых олигосахаридных цепей, пока неизвестно. Данная степень гетерогенности необычна, большинство гликопротеинов образуют гораздо более резкие полосы при электрофорезе в полиакриламидном геле с ДСН. Хотя на каждый эритроцит приходится до 350 000 молекул этого белка (столько же, сколько гликофорина и белка полосы 3), однако в течение многих лет он оставался незамеченным. К тому же существовали противоречивые мнения относительно молекулярной идентификации переносчика глюкозы, его молекулярный вес оценивали величинами до 200 000 Да. Причиной была размытость, нечеткость его полосы при электрофорезе.

Литература: Allard, W. J., Leinhard, G. E. Monoclonal antibodies to the glucose transporter from human erythrocytes: identification of the transporter as a Mr = 55,000 protein. J. Biol. Chem. 260: 8668- 8675, 1985.

Транспорт через мембрану малых молекул

6-20

- А. мембранные транспортные
- Б. переносчики; каналы
- В. пассивный (облегченная диффузия); активный
- Г. электрохимический
- Д. симпорт
- Е. анионы; антипорт
- Ж. $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насос, или $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -АТРаза
- З. саркоплазматический ретикулум
- И. $\text{Na}^+ - \text{H}^+$; амилорид
- К. микроворсинки
- Л. перенос групп
- М. порины; периплазматические субстрат-связывающие
- Н. каналы; ионные каналы
- О. изменения потенциала; механическая стимуляция; связывание лиганда; изменения концентраций ионов
- П. мембранный потенциал (потенциал покоя); K^+
- Р. потенциал действия
- С. локальная фиксация потенциала (пэтч-кламп)
- Т. регулируемый потенциалом; тетродотоксин; сакситоксин
- У. химические синапсы; нейромедиатор
- Ф. ацетилхолин; рецепторы ацетилхолина
- Х. ионофоры; подвижные переносчики ионов; каналообразующие ионофоры; K^+ , Ca^{2+}

6-21

- А. Неправильно. Для ионов непроницаемы липидные бислои, но в плазматической мембране имеются специфичные ионные каналы и переносчики, которые делают ее легко проницаемой для некоторых ионов при определенных условиях.
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. Представление о работе белков-переносчиков по типу вращающейся двери предполагает, что они постоянно перемещаются из одного монослоя мембраны в другой. В действительности же этого не происходит.
- Г. Правильно.
- Д. Правильно.
- Е. Неправильно. Цикл фосфорилирования и дефосфорилирования Ca^{2+} -насоса аналогично циклу $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насоса составляет часть механизма его действия, и гидролиз АТФ дает энергию для переноса ионов против высокого электрохимического градиента. Выход Ca^{2+} из саркоплазматического ретикула происходит не через Ca^{2+} -насос, а через другой канал, природа и механизм регуляции которого пока не выяснены.
- Ж. Неправильно. Нет прямой связи между протонной помпой, активируемой светом (которая, действительно, выкачивает протоны из клеток бактерий на свету) и синтезом или гидролизом АТФ. Однако бактерии обладают особым мембранным белком, который может действовать как АТФ-синтетаза, перенося протоны внутрь клетки.
- З. Правильно.
- И. Правильно.
- К. Неправильно. Хотя $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насос является электрогенным и вносит небольшой (20%) прямой вклад в мембранный потенциал из-за неэквивалентности обмена, в основном мембранный потенциал создается за счет канала утечки K^+ , делающего мембрану

селективно проницаемой для K^+ . $[(Na^+ + K^+)$ -насос вносит важный, хотя и непрямой вклад в мембранный потенциал, поддерживая градиент K^+ через мембрану].

Л. Правильно.

М. Правильно.

Н. Правильно.

6-22

- А. Эти данные показывают, что стимуляция инсулином поглощения глюкозы происходит вследствие перераспределения уже существующих молекул переносчика глюкозы, т. е. за счет их перемещения из внутриклеточного пула в плазматическую мембрану. Пятикратное увеличение скорости поглощения глюкозы клетками, обработанными инсулином, сопровождается пятикратным увеличением числа молекул переносчика глюкозы в плазматической мембране и соответствующим уменьшением их числа во фракции внутренних мембран.
- Б. Величины K_M и V_{max} не изменяются. Величина K_M для транспорта глюкозы в обоих случаях – интактных и обработанных инсулином клеток – равна 2 мМ, т. е. при этой концентрации глюкозы в обоих случаях скорость транспорта равна половине от максимальной величины (рис. 6-9). Пятикратное увеличение скорости транспорта глюкозы можно полностью объяснить пятикратным увеличением числа молекул переносчика в плазматической мембране. Может удивить то, что пятикратное увеличение скорости транспорта не связано с соответствующим возрастанием V_{max} , однако V_{max} – максимальная скорость при определенном количестве фермента. Когда наблюдаемые в эксперименте скорости пересчитывают с учетом пятикратной разницы в числе молекул переносчика, то максимальные значения скорости транспорта оказываются идентичными, следовательно, V_{max} не изменилась.

6-23

- А. Если бы все изменение свободной энергии при гидролизе АТФ ($\Delta G = -12$ ккал/моль) могло быть использовано на обеспечение процессов транспорта, то образование за счет этого максимально возможного градиента концентрации сопровождалось бы изменением свободной энергии, равным +12 ккал/моль.

$$\Delta G_{in} = -2,3RT \log_{10} \frac{C_o}{C_i} + zFV.$$

Перепишем это уравнение следующим образом:

$$\log_{10} \frac{C_o}{C_i} = \frac{-\Delta G_{in} + zFV}{2,3RT}.$$

Для незаряженных веществ член уравнения, относящийся к электрическому заряду, (zFV) равен нулю. Тогда

$$\log_{10} \frac{C_o}{C_i} = \frac{-\Delta G_{in}}{2,3RT}.$$

Подставив числовые значения ΔG_{in} , R и T , получим

$$\log_{10} \frac{C_o}{C_i} = \frac{-12 \text{ ккал/моль}}{2,3 \times 1,98 \times 10^{-3} \text{ ккал/(К} \times \text{моль)} \times 310 \text{ К}}$$

$$\log_{10} \frac{C_o}{C_i} = -8,50$$

$$\log_{10} \frac{C_i}{C_o} = 8,50$$

$$\frac{C_i}{C_o} = 3,2 \times 10^8.$$

Таким образом, в случае незаряженного вещества система транспорта, в которой за счет гидролиза 1 моля АТР переносится 1 моль растворенного вещества, могла бы в принципе обеспечить такой концентрационный градиент через мембрану, при котором концентрации вещества по две стороны от мембраны различались бы более чем на восемь порядков. Удивительно!

- В. Если бы все изменение свободной энергии при гидролизе АТР ($\Delta G = -12$ ккал/моль) могло быть использовано на транспорт Ca^{2+} из клетки, то образование максимального концентрационного градиента сопровождалось бы изменением свободной энергии, равным $+12$ ккал/моль:

$$\Delta G_{\text{out}} = 2,3RT \log_{10} \frac{C_o}{C_i} - zFV.$$

Перепишем это уравнение: $\log_{10} \frac{C_o}{C_i} = \frac{\Delta G_{\text{out}} + zFV}{2,3RT}$. Поскольку Ca^{2+} – заряженная частица, то необходимо учесть электростатическую составляющую. Подставив соответствующие числовые значения, получим

$$\log_{10} \frac{C_o}{C_i} = \frac{12 \text{ ккал/моль} + [2 \times 23 \text{ ккал/(В} \times \text{моль)} \times (-0,06\text{В})]}{2,3 \times 1,98 \times 10^{-3} \text{ ккал/(К} \times \text{моль} \times 310 \text{ К})}$$

$$\log_{10} \frac{C_o}{C_i} = 6,54$$

$$\frac{C_o}{C_i} = 3,5 \times 10^6.$$

Таким образом, транспортная система, в которой гидролиз 1 моля АТР сопряжен с переносом 1 моля Ca^{2+} за пределы клетки, могла бы в принципе обеспечить градиент концентрации на мембране, превышающий 6 порядков. Сравнивая этот расчет с аналогичным расчетом для незаряженного растворенного вещества, можно отметить, что в случае переноса против мембранного потенциала величина теоретического предела снижается на два порядка. Градиент концентраций Ca^{2+} на плазматической мембране клеток млекопитающих обычно составляет более четырех порядков, что значительно ниже теоретического предела.

- В. Изменение свободной энергии при транспорте Na^+ из клетки можно вычислить следующим образом:

$$\Delta G_{\text{out}} = 2,3RT \log_{10} \frac{C_o}{C_i} - zFV.$$

Подставляя численные значения ($2,3RT = 1,41$ ккал/моль), получаем:

$$\Delta G_{\text{out}} = \left(1,41 \text{ ккал/моль} \times \log_{10} \frac{145 \text{ mM}}{10 \text{ mM}} \right) - \left(1 \times \frac{23 \text{ ккал}}{\text{В} \times \text{моль}} \times [-0,06\text{В}] \right)$$

$$\Delta G_{\text{out}} = 3,0 \text{ ккал/моль } \text{Na}^+$$

$$\Delta G_{\text{out}} = 9,0 \text{ ккал/3 моль } \text{Na}^+.$$

Изменение свободной энергии при транспорте K^+ в клетку составляет

$$\Delta G_{\text{in}} = -2,3RT \log_{10} \frac{C_o}{C_i} + zFV.$$

Подставляя численные значения ($2,3RT = 1,41 \text{ ккал/моль}$), получаем:

$$\Delta G_{\text{in}} = - \left(1,41 \text{ ккал/моль} \times \log_{10} \frac{5 \text{ мМ}}{140 \text{ мМ}} \right) +$$

$$+ \left(1 \times \frac{23 \text{ ккал}}{\text{В моль}} \times [-0,06\text{В}] \right),$$

$$\Delta G_{\text{in}} = 0,66 \text{ ккал/моль } \text{K}^+,$$

$$\Delta G_{\text{in}} = 1,3 \text{ ккал/2 моль } \text{K}^+.$$

Полное изменение свободной энергии при работе $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насоса можно оценить таким образом:

$$\Delta G = \Delta G_{\text{out}} + \Delta G_{\text{in}},$$

$$\Delta G = 9,0 \text{ ккал/3 моль } \text{Na}^+ + 1,3 \text{ ккал/2 моль } \text{K}^+,$$

$$\Delta G = 10,3 \text{ ккал/(3 моль } \text{Na}^+ \text{ и 2 моль } \text{K}^+).$$

- Г. При гидролизе АТФ освобождается 12 ккал/моль, а для транспорта 3 Na^+ из клетки и 2 K^+ в клетку требуется 10,3 ккал/моль, следовательно, эффективность $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насоса равна

$$\text{eff} = \frac{10,3}{12,0} = 86\%.$$

Даже при такой высокой эффективности на работу насоса обычно расходуется треть энергетических ресурсов в клетках млекопитающих и, следовательно, такова же связанная с ним доля общего потребления энергии целым организмом.

6-24

- А. Ожидаемая величина мембранного потенциала, возникающего в состоянии покоя за счет разницы в концентрациях K^+ по две стороны мембраны, равна

$$V = 58 \text{ мВ} \times \log_{10} \frac{C_o}{C_i},$$

$$V = 58 \text{ мВ} \times \log_{10} \frac{9 \text{ мМ}}{344 \text{ мМ}},$$

$$V = -92 \text{ мВ}.$$

Для Na^+ такой же расчет дает величину +48 мВ.

Если допустить, что мембранный потенциал создается только за счет градиента $[\text{K}^+]$, то его величина должна быть близка к величине потенциала покоя. Если предположить, что мембранный потенциал создается только за счет градиента $[\text{Na}^+]$, то его величина должна быть близка к величине потенциала действия.

Эти предположения позволяют приблизительно оценить потенциалы покоя и действия, поскольку за потенциал покоя ответствен главным образом K^+ , а за потенциал действия — Na^+ . В состоянии покоя мембрана в сто раз более проницаема для ионов K^+ , чем для

Na^+ из-за существования каналов утечки K^+ . Такие каналы позволяют ионам K^+ выходить из клетки, пока мембранный потенциал не увеличится настолько, чтобы противостоять градиенту концентрации K^+ . Теоретически возможный максимальный градиент (по расчетам, подобным приведенным выше) несколько снижается за счет поступления в клетку ионов Na^+ , которые несут положительные заряды (компенсирующие потерю положительных зарядов при выходе ионов K^+ из клетки). Если бы не было $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насоса, непрерывно откачивающего ионы Na^+ , потенциал покоя должен был бы полностью исчезнуть.

Потенциал действия возникает благодаря другому каналу – потенциалзависимому Na^+ -каналу. При возбуждении мембраны этот канал открывается, что позволяет ионам Na^+ войти в клетку. Величина результирующего мембранного потенциала определяется разностью концентраций Na^+ по две стороны мембраны. Поток ионов Na^+ , входящий в клетку, приводит к снижению мембранного потенциала на данном участке мембраны, что вызывает открытие соседних с ним каналов для Na^+ и одновременно распространение потенциала действия от участка первоначальной стимуляции.

- Б. Как и ожидалось, замена хлорида натрия хлоридом холина приводит к исчезновению потенциала действия, так как последний обусловлен работой особых каналов для Na^+ . Как показывают приведенные выше расчеты, разность концентраций Na^+ через мембрану определяет величину потенциала действия, который возникает в результате входа Na^+ в клетку. Таким образом, если концентрация Na^+ снаружи клетки снижается до половины от нормальной величины, то, согласно расчету, должен уменьшиться вдвое и мембранный потенциал. Измерения потенциала действия для разных смесей хлорида холина и хлорида натрия подтверждают эти ожидания.

Литература: Hille, B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, pp. 23–57. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, 1984.

6-25

- А. Во время единичного потенциала действия в аксон поступает 340 импульсов радиоактивного натрия в минуту. При удельной активности 2×10^{14} имп/(мин · моль) это включение соответствует входу $1,7 \times 10^{-12}$ моль натрия:

$$\text{входящий } \text{Na}^+ = \frac{340 \text{ имп/мин}}{\text{аксон}} \times \frac{\text{моль}}{2 \times 10^{14} \text{ имп/мин}} = 1,7 \times 10^{-12} \text{ моль/аксон.}$$

Площадь мембраны гигантского аксона в этом эксперименте составляла $1,6 \text{ см}^2$:

$$\text{площадь} = \pi Dh = 3,14 \times 0,1 \text{ см} \times 5 \text{ см} = 1,6 \text{ см}^2.$$

Таким образом, количество входящих в аксон ионов в расчете на 1 см^2 его поверхности равно

$$\text{входящий } \text{Na}^+/\text{см}^2 = \frac{1,7 \times 10^{-12} \text{ моль}}{\text{аксон}} \times \frac{\text{аксон}}{1,6 \text{ см}^2} = 1,1 \times 10^{-12} \text{ моль/см}^2.$$

Таким образом, результаты экспериментальных измерений соответствуют теоретически рассчитанным величинам.

- Б. Точно такое же количество ионов K^+ должно при этом выйти из

аксона, чтобы снова установился потенциал покоя: ведь ионы Na^+ вошли в аксон во время потенциала действия. В результате из клетки должно выйти $1,7 \times 10^{-12}$ моль K^+ .

В. Объем данного гигантского аксона равен 39 мкл:

$$\text{объем} = \pi r^2 h = 3,14 \times (0,05 \text{ см})^2 \times 5 \text{ см} = 0,039 \text{ см}^3 = 0,039 \text{ мл} = 39 \text{ мкл.}$$

При концентрации Na^+ 65 мМ в аксоне содержится $1,5 \times 10^{18}$ ионов Na^+ :

$$\begin{aligned} \text{число ионов } \text{Na}^+ &= \frac{65 \text{ ммоль } \text{Na}^+}{\text{л}} \times \frac{(39 \times 10^{-6} \text{ л})}{\text{аксон}} \times \\ &\times \frac{(6,0 \times 10^{20} \text{ Na}^+)}{\text{ммоль } \text{Na}^+} = 1,5 \times 10^{18} \text{ Na}^+/\text{аксон.} \end{aligned}$$

На протяжении потенциала действия в аксон входит 1×10^{12} ионов Na^+ :

$$\begin{aligned} \text{входящий } \text{Na}^+ &= \frac{1,7 \times 10^{-12} \text{ моль}}{\text{аксон}} \times \frac{6,0 \times 10^{23} \text{ Na}^+}{\text{моль}} = \\ &= 1,0 \times 10^{12} \text{ Na}^+/\text{аксон.} \end{aligned}$$

Таким образом, во время единичного потенциала действия внутриклеточная концентрация Na^+ в гигантском аксоне кальмара повышается менее, чем на одну миллионную часть:

$$\text{повышение } [\text{Na}^+] = \frac{1,0 \times 10^{12}}{1,5 \times 10^{18}} = 6,7 \times 10^{-7}.$$

Г. Один из подходов к решению этой задачи заключается в том, чтобы пересчитать необходимые величины после подстановки в формулу величины радиуса дендрита (0,05 мкм). Есть, однако, и короткий путь, который основан на том, что для нервов равной длины число входящих ионов Na^+ зависит от r (площадь поверхности $= 2\pi rh$), тогда как число ионов Na^+ , содержащихся в аксоне, зависит от r^2 (объем $= \pi r^2 h$). Так как радиус дендрита в 10^4 раз меньше, чем радиус гигантского аксона, его поверхность тоже в 10^4 раз меньше; таким образом, во время потенциала действия в дендрит будет входить в 10^4 раз меньше ионов Na^+ , чем в аксон. Однако объем дендрита в 10^8 раз меньше, чем объем гигантского аксона, поэтому в нем содержится в 10^8 раз меньше ионов Na^+ . Следовательно, относительное увеличение внутриклеточной концентрации ионов Na^+ в дендрите (в $6,7 \times 10^{-3}$ раз) в 10^4 раз выше, чем это увеличение в аксоне кальмара.

Д. Поскольку внутриклеточная концентрация ионов Na^+ в дендрите возрастает почти на 1% во время каждого потенциала действия (по сравнению с 0,0001% для гигантского аксона), удаление ионов Na^+ с помощью $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -насоса является в непрерывной работе маленького дендрита более критическим моментом, чем в работе гигантского аксона кальмара.

Литература: Hille, B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, pp. 1 19, Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, 1984.

6-26

А. Потенциал покоя в обычной морской воде равен

$$V = 58 \text{ мВ} \times \log_{10} \frac{9 \text{ мМ}}{344 \text{ мМ}} = -92 \text{ мВ},$$

тогда как потенциал покоя в морской воде, содержащей 60 мМ KCl, равен

$$V = 58 \text{ мВ} \times \log_{10} \frac{60 \text{ мМ}}{344 \text{ мМ}} = -44 \text{ мВ}.$$

Таким образом, эта величина уменьшается более чем вдвое.

Б. Тот факт, что в отсутствие Ca^{2+} активации не происходит, заставляет предположить, что для активации необходим вход ионов кальция в клетку из внеклеточной жидкости. Изменение мембранного потенциала в ответ на увеличение концентрации KCl приводит к открыванию потенциалзависимого Ca^{2+} -канала в плазматической мембране. Вход Ca^{2+} инициирует затем другие внутриклеточные изменения.

В. Как можно ожидать, исходя из предыдущего ответа (пункт Б), добавление ионофора A23187 активирует изменения в яйце, находящемся в обычной морской воде, но не в морской воде, лишенной ионов кальция.

Не все яйца сходны в этом отношении с яйцами морских двусторчатых моллюсков, но многие могут активироваться под влиянием некоторых изменений ионного состава среды обитания. Судя по этим данным, роль спермы не ограничивается только обеспечением будущего потомства своей долей дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). В том случае, который привел вас в изумление, яйца, активированные в результате изменения ионного состава среды, а не под действием спермы, не развивались в эмбрионы, хотя часто претерпевали превращения, подобные, хотя и не полностью, циклам клеточного деления.

6-27

А. Отсутствие насыщения при связывании токсина указывает на то, что токсин связывается в препарате дополнительно с чем-то еще кроме рецепторного участка. Такие дополнительные участки не являются специфическими для токсина, в противном случае должно было бы в конце концов наступить их насыщение, чего не происходит. Чтобы оценить масштаб неспецифического связывания, и был поставлен контрольный эксперимент. В нем добавление избыточного количества нерадиоактивного токсина приводит к освобождению меченого токсина, связавшегося со специфическими рецепторными участками. Следовательно, при большом молярном избытке немеченого токсина подавляющая часть связанного с рецептором токсина становится немеченой, т.е. молекулы немеченого токсина конкурируют с молекулами меченого токсина за участки специфического связывания. В то же время в участках неспецифического связывания вследствие фактической неограниченности их числа немеченый токсин не влияет на связывание меченого токсина. Следовательно, немеченый токсин не конкурирует с меченым за неспецифические участки. Таким образом, в присутствии немеченого токсина нервные клетки ведут себя по отношению к меченому лиганду так, как если бы они не имели Na^{+} -каналов. В результате радиоактивный токсин связывается только неспецифически. Вычитая неспецифическую компоненту из общего связывания, получим кривую специфического связывания; она, как и ожидалось, показывает насыщение (рис. 6-16).

Б. Согласно скорректированной кривой, количество токсина, связывающегося с нервом, составляет 100 пмоль на 1 г нерва. Это соответствует $6,0 \times 10^{13}$ молекулам токсина:

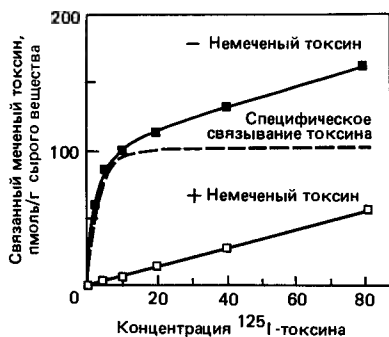


Рис. 6-16. Кривая специфического связывания токсина (ответ 6-27).

$$\begin{aligned} \text{связанный токсин} &= 100 \text{ пмоль} \times \frac{6,0 \times 10^{23} \text{ молекул}}{\text{моль}} \times \\ &\times \frac{\text{моль}}{10^{12} \text{ пмоль}} = 6 \times 10^{13} \text{ молекул.} \end{aligned}$$

Предполагая, что на один канал приходится один связывающий участок, можно рассчитать также, что на 1 г нерва приходится $6,0 \times 10^{13}$ Na^+ -каналов. Так как на 1 г нерва приходится 6000 см^2 мембраны, то на 1 см^2 мембраны должно приходиться 1×10^{10} каналов, что соответствует 100 каналам для ионов Na^+ на 1 мкм^2 ($1 \text{ см} = 10^4 \text{ мкм}$).

При радиусе 3 нм каждый канал будет иметь сечение 28 нм^2 (площадь $= \pi r^2$). Таким образом, на каждом квадратном микроне (1 мкм^2) мембраны Na^+ -каналы покрывают площадь $2,8 \times 10^3 \text{ нм}^2$ ($100 \times 28 \text{ нм}^2$).

Поскольку $1 \text{ мкм}^2 = 10^6 \text{ нм}^2$, следовательно, на Na^+ -каналы приходится 0,3% поверхности плазматической мембраны. Этот результат дает представление о том, сколь малая доля общей клеточной мембраны должна быть занята ионными каналами, имеющими ворота, чтобы клетка проявляла свойство возбудимости.

Литература: Hille, B. *Ionic Channels of Excitable Membranes*, pp. 205–209. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, 1984.

Мембранный транспорт макромолекул и частиц: экзоцитоз и эндоцитоз

6-28

- А. экзоцитоз
- Б. эндоцитоз
- В. гистамин; тучные
- Г. пиноцитоз; фагоцитоз
- Д. лизосомы; эндосомы
- Е. окаймленные ямки
- Ж. клатрин; трискелион
- З. эндоцитоз, опосредуемый рецептором; жидкофазный эндоцитоз
- И. липопroteины низкой плотности
- К. эндосомальный; периферические эндосомы; перинуклеарные (внутренние) эндосомы
- Л. трансферрин
- М. фактор роста эпидермиса (ФРЭ)
- Н. понижающая регуляция
- О. транцитоз
- П. перенос участков мембран; кэппинг
- Р. макрофаги; нейтрофилы
- С. фагоцитоз; фагосомы; фаголизосомы
- Т. слияние мембран; вызывающие слияние

6-29

- А. Правильно.
- Б. Неправильно. Различие между двумя путями секреции триггерным и конститутивным – заключается в том, что в первом систематически блокируется экзоцитоз секреторных везикул, а во втором пути экзоцитоз везикул происходит постоянно и беспрепятственно.
- В. Правильно.

- Г. Правильно.
- Д. Правильно.
- Е. Правильно.
- Ж. Неправильно. Сортировка происходит в кислой среде внутри эндосом, а не в лизосомах.
- З. Неправильно. Подкисление внутри эндосом происходит в результате работы АТР-зависимой протонной помпы, называемой вакуолярной протонной АТРазой.
- И. Неправильно. Трансферрин переносит в клетки железо. Ферритин связывает железо и сохраняет его в цитозоле.
- К. Неправильно. Рецепторы трансферрина не разрушаются, поскольку вообще не попадают в лизосомы; они непрерывно возвращаются от эндосом обратно к поверхности клетки, где опять захватывают железо.
- Л. Правильно.
- М. Правильно.
- Н. Правильно.
- О. Правильно.
- П. Правильно.

6-30

- А. Везикулы, относящиеся к механизму эндоцитоза, будут метиться коллоидным золотом, а везикулы экзоцитозного пути – ферритином.
- Б. Везикулы, покрытые клатрином, ферментативно «раздеваются» в течение нескольких секунд после отшнуровывания от плазматической мембраны, так что некоторые из них будут зафиксированы уже без оболочки, а другие – еще с оболочкой.

6-31

- А. При 0 °С эндоцитоз прекращается, следовательно, меченые рецепторы трансферрина задерживаются на поверхности и подвергаются действию трипсина. Большинство рецепторов в интактных клетках нечувствительны к трипсину, потому что они находятся внутри клеток (преимущественно в эндосомах) и, следовательно, не доступны для трипсина. Когда клетки инкубируют при 37 °С, меченые рецепторы в процессе эндоцитоза отделяются от мембраны вместе с эндосомами, тем самым становясь недоступными для действия трипсина.
- Б. И опыты по связыванию антител, и результаты обработки трипсином указывают на то, что 30% всех рецепторов трансферрина находятся на поверхности клеток. Когда создаются условия для оборота рецепторов трансферрина (инкубация при 37 °С), то именно 30% их оказываются доступны действию трипсина в интактных клетках, следовательно, столько рецепторов одновременно присутствует на поверхности.

Подобно этому, антитела связывают около 30% рецепторов в отсутствие детергента ($0,54\%/1,76\% = 30\%$). Поскольку оборот рецепторов трансферрина очень высок (см. задачу 6-32), то их распределение между поверхностью и внутренними компартментами клетки является равновесным.

Литература: Bleil, J. D., Bretscher, M. S. Transferrin receptor and its recycling in HeLa cells. EMBO J. 1:351–355, 1982.

6-32

- А. При температуре 37 °С рецепторы трансферрина циркулируют

между плазматической мембраной и эндосомальным компартментом клетки. Сначала метятся все рецепторы на поверхности плазматической мембраны, а все эндосомальные рецепторы остаются немечеными. Следовательно, каждый рецептор, который интернализуется (погружается внутрь клетки) вначале, является меченым. В этот же начальный период, когда меченый рецептор попадает внутрь клетки, его замещает на клеточной поверхности немеченый рецептор, что приводит к разбавлению метки на клеточной поверхности. По этой причине скорость вхождения меченых рецепторов в клетку является вначале высокой, а затем снижается, хотя поток рецепторов в клетку остается постоянным. Позже меченые рецепторы начнут вновь появляться на поверхности клетки, потому что они возвращаются в мембрану. В конце концов меченые и немеченые рецепторы распределяются равномерно между плазматической мембраной и эндосомами. В таком состоянии скорость погружения меченых рецепторов внутрь клетки и скорость их последующего возвращения на поверхность уравниваются, так что достигается уровень плато.

- Б. В исходной точке все рецепторы находятся на поверхности клетки. Начальная скорость их погружения внутрь клетки равна 100% за 7 мин, или 14% поверхностных рецепторов клетки в минуту.
- В. Когда достигается уровень плато, 30% меченых рецепторов чувствительны к трипсину; следовательно, столько рецепторов находится на поверхности клетки. Если 14% поверхностных рецепторов интернализуются за одну минуту, то от всей популяции рецепторов это составляет 4,2% ($30\% \times 14\%$).
- Г. При скорости 4,2% в минуту количество рецепторов, эквивалентное всей их популяции, должно интернализироваться за 24 мин ($100\% / 4,2\%$ в мин). Поскольку скорость погружения и скорость последующего возвращения равны, то эквивалентное всей популяции количество рецепторов должно возвращаться на поверхность клетки каждые 24 мин. Таким образом, период 24 мин представляет собой среднее время, за которое рецепторы трансферрина проходят цикл от клеточной поверхности в эндосомальный компартмент и вновь к поверхности клетки.
- Д. Если средняя продолжительность цикла составляет 24 мин, а на поверхности клетки в любой момент времени находятся 30% рецепторов, то каждый рецептор проводит у поверхности в среднем около 7 мин ($24 \text{ мин} \times 30\%$) и внутри клетки — около 17 мин.

Литература: Bleil, J. D., Bretscher, M. S. Transferrin receptor and its recycling in HeLa cells. EMBO J. 1: 351–355, 1982.

6-33

- А. Связывание ЛНП нормальными клетками и клетками больного II достигает плато, потому что число рецепторов ЛНП на клетку ограничено, и они насыщаются при высоком уровне ЛНП. Наклон кривой связывания служит мерой сродства, а уровень плато — мерой общего числа связывающих участков (около 20 000–50 000, хотя более точно по приведенным здесь данным рассчитать невозможно). У больного II число рецепторов на клетку несколько меньше, но по степени сродства к ЛНП они подобны рецепторам нормальных клеток. Клетки больного I по существу не связывали ЛНП даже при насыщающей концентрации последних в среде. Эти клетки либо полностью лишены рецептора ЛНП, либо рецептор имеет такой дефект, что его сродство к ЛНП чрезвычайно понижено. Можно также предположить, что рецепторы имеются, но по какой-то причине они расположены не на поверхности клетки.

- Б. В клетки обоих больных гиперхолестеролемией ЛНП не проникают. Причину легко объяснить для больного I, у которого ЛНП не связываются с клетками: нет рецептора — нет поглощения. Из этого следует, что рецептор является решающим фактором для попадания холестерина, входящего в состав частиц ЛНП, в клетку. Поскольку ЛНП не проникают и в клетки больного II, напрашивается вывод, что его рецепторы ЛНП также, по-видимому, имеют дефект, но иной, чем у больного I. Клетки больного II связывают ЛНП с тем же сродством, что и нормальные, и почти на том же уровне. Таким образом, связывающая способность рецепторов не нарушена, но, несмотря на это, ЛНП не поступают внутрь клеток. Следовательно, одного лишь присутствия рецепторов на поверхности клеток не достаточно для попадания связываемого ими вещества внутрь клетки.
- В. ЛНП должны попасть в клетку, чтобы содержащиеся в них простые эфиры холестерина высвободились и гидролизировались до холестерина, который вызывает подавление внутриклеточного синтеза холестерина. У здоровых людей все именно так и происходит. У больных же ЛНП в клетку не проникают и, следовательно, синтез холестерина в ней не ингибируют.
- Г. Если нарушения у больных с гиперхолестеролемией происходят только из-за дефектов в рецепторах ЛНП, то в их клетках свободный холестерин должен подавлять синтез холестерина так же, как и в нормальных. В приведенных выше случаях свободный холестерин действовал именно таким образом. Это убедительно подтверждает мысль о том, что причина гиперхолестеролемии связана только с рецепторами ЛНП.

Литература: Brown, M. S., Goldstein, J. L. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 3330 - 3337, 1979.

6-34.

- А. Поскольку ген для рецептора липопротеинов низкой плотности (ЛНП) человека является аутосомным, то в клетке имеется две его копии, по одной от каждого родителя. Мать больного II, очевидно, имеет один нормальный ген и один дефектный ген; последний кодирует рецептор, не способный связывать ЛНП. Обладая только одним нормальным геном ее клетки способны связывать лишь половину того количества ЛНП, которое связывают клетки здорового человека, однако связываемые частицы ЛНП нормально интернализуются. Видимо, мать передала сыну дефектный ген, в противном случае у больного II некоторые из его ЛНП-рецепторов могли бы погружаться в клетку.
- Б. Клетки отца больного II обычно интернализуют около половины связываемых ЛНП, но никогда все целиком; это можно объяснить тем, что отец этого больного также имеет один нормальный и один дефектный ген. Таким образом, у отца умеренная гиперхолестеролемия развилась по той же причине, что и у матери. Однако дефектный ген отца в отличие от дефектного гена матери кодирует рецептор, который может связывать ЛНП, но не может их интернализовать. Отец больного II также передал сыну именно дефектный ген.

Поведение дефектной популяции рецепторов у отца очень похоже на поведение рецепторов у больного II. Причиной дефекта у отца не могут быть нарушения механизма интернализации. Если бы дело было в этом, то все связанные частицы ЛНП у отца

должны были бы вести себя одинаково. Однако оказалось, что только половина из них проникает в клетки нормально, а другая половина, по-видимому, не проникает никогда.

- В. Неспособность больного II метаболизировать ЛНП, по-видимому, является прямым следствием приобретения им двух дефектных генов рецепторов от обоих родителей. От матери больной получил ген рецептора ЛНП с дефектом по связыванию, а от отца — ген рецептора ЛНП с дефектом по интернализации. Поскольку дефектны оба гена, у больного II развивается тяжелая гиперхолестеролемиа. Поведение рецепторов на поверхности клеток больного II похоже на поведение дефектной популяции рецепторов в клетках его отца. Остается неясным, почему эти дефектные рецепторы присутствуют в большей концентрации, чем нормальные (как у больного, так и у его отца); возможно, неспособность к интернализации обуславливает большую длительность жизни этих рецепторов по сравнению с нормальными.
- Г. Данные электронной микроскопии свидетельствуют о том, что в нормальных клетках около половины рецепторов ЛНП находится в области окаймленных ямок, хотя эти образования занимают лишь 2% клеточной поверхности. У клеток больного II только 2,8% его рецепторов ЛНП обнаруживаются в окаймленных ямках, что близко к результату чисто случайного распределения. Это позволяет предположить, что рецепторы ЛНП больного II дефектны по определенному домену (скорее всего обращенному в сторону цитоплазмы), который необходим для локализации рецептора в области окаймленной ямки. Попав в нее, он может быть поглощен путем эндоцитоза. Вне этой специальной поглощающей ямки шанс попасть внутрь клетки у рецептора минимален: поэтому и низка скорость интернализации рецептора у больного II.

Литература: Brown, M. S., Goldstein, J. L. Receptor-mediated endocytosis: Natl. Acad. Sci. USA 76: 3330–3337, 1979.

6-35

- А. На поверхности клеток нет специфического рецептора для пероксидазы хрена (ПХ), и этот фермент попадает в них только в процессе жидкофазного эндоцитоза. Поскольку эндоцитоз является постоянным (конститутивным) процессом, то ПХ должна непрерывно поступать в клетку, и ее потребление не достигает насыщения. В противоположность этому фактор роста эпидермиса (ФРЭ) связывается со своим специфическим рецептором, а затем попадает внутрь в результате эндоцитоза, опосредуемого рецепторами. Предельное количество ФРЭ, которое может поглощаться клеткой, определяется числом его рецепторов на поверхности; когда рецепторы насыщаются, никакого дальнейшего возрастания поглощения не происходит (за исключением случаев необычно высокого содержания этого фактора в среде, когда очень сильно возрастает роль жидкофазного эндоцитоза).
- Б. При насыщении количество связанного ФРЭ составляет $4 \text{ пмоль} \times 10^6 \text{ клеток}$. Из этого следует, что

$$\begin{aligned} \text{ФРЭ (связанный)} &= \frac{4 \times 10^{-12} \text{ моль ФРЭ}}{10^6 \text{ клеток}} \times \frac{6 \times 10^{23} \text{ молекул}}{\text{моль}} = \\ &= 2,4 \times 10^6 \text{ ФРЭ молекул/клетка.} \end{aligned}$$

Это число рецепторов приблизительно в 10 раз больше, чем в обычных клетках. Клеточная линия, используемая в этих исследованиях, и была выбрана из-за высокого содержания рецепторов

ФРЭ, которое частично может объясняться ее опухолевой природой.

- В. В эндоцитозных везикулах с радиусом 20 нм (2×10^{-6} см) содержится $3,3 \times 10^{-17}$ мл жидкости, что следует из простого расчета:

$$\begin{aligned}\text{объем везикулы} &= 4/3\pi r^3 \\ &= 4/3 \times 3,14 \times (2 \times 10^{-6} \text{ см})^3 \\ &= 3,3 \times 10^{-17} \text{ мл/везикула.}\end{aligned}$$

В 1 мл раствора содержится $1,5 \times 10^{16}$ молекул ПХ:

$$\begin{aligned}\text{ПХ} &= \frac{1 \text{ мг ПХ}}{\text{мл}} \times \frac{\text{ммоль}}{40\,000 \text{ мг}} \times \frac{6,0 \times 10^{20} \text{ молекул}}{\text{ммоль}} = \\ &= 1,5 \times 10^{16} \text{ молекул/мл.}\end{aligned}$$

Следовательно, в каждой везикуле должно находиться в среднем по 0,5 молекулы ПХ:

$$\text{ПХ} = \frac{1,5 \times 10^{16} \text{ молекул}}{\text{мл}} \times \frac{3,3 \times 10^{-17} \text{ мл}}{\text{везикула}} = 0,5 \text{ молекул/везикула.}$$

Поскольку лишь половина везикул содержит ПХ при концентрации фермента 1 мг/мл, не вызывает удивления тот факт, что при концентрации ПХ в 50 раз более низкой, положительную окраску на фермент давало очень мало везикул.

- Г. Результаты расчетов, отмеченные авторами, указывают на то, что клетки, имеющие на своей поверхности специфические, прочно связывающие рецепторы, могут поглощать соответствующие молекулы с гораздо большей скоростью, чем если бы они просто поглощали жидкость с содержащимися в ней молекулами. Аналогично этому можно найти в рыбной ловле. Случайным образом забрасывая сеть в поток, можно случайно поймать рыбу. Но если сначала вместе с сетью забросить приманку, то шансы на успешную ловлю колоссально возрастут. Каждый раз, когда молекула ФРЭ встречается с рецептором, она как бы прилипает к нему и перемещается вместе с ним к окаймленной ямке, чтобы затем оказаться внутри клетки. Если бы молекулы ФРЭ просто вылавливались из среды как ПХ, то скорость их поглощения клеткой была бы ничтожной при существующих *in vivo* концентрациях.

Литература: Haigler, H. T., McKanna, J. A., Cohen, S. Rapid stimulation of pinocytosis in human A-431 carcinoma cells by epidermal growth factor. *J. Cell Biol.* 83:82-90, 1979.

Преобразование энергии: митохондрии и хлоропласты

Митохондрии

7-1

- А. матрикс; межмембранное пространство
- Б. наружная
- В. дыхательная (электронтранспортная) цепь; внутренняя
- Г. кристы
- Д. триацилглицеролы (триглицериды)
- Е. гликоген
- Ж. цикл лимонной кислоты (цикл трикарбоновых кислот, или цикл Кребса)
- З. окислительное фосфорилирование
- И. электрохимический протонный градиент
- К. протондвижущая
- Л. АТФ-синтаза

7-2

- А. Неправильно. Вещество межмембранного пространства действительно химически эквивалентно цитозоллю по содержанию низкомолекулярных соединений, потому что в наружной митохондриальной мембране имеется много копий транспортного белка, образующего крупные водные каналы, но состав матрикса намного более специфичен, так как транспортные белки внутренней митохондриальной мембраны обеспечивают прохождение через нее лишь ограниченного набора малых молекул.
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. Клетки животных запасают «горючее» в форме жиров (содержащих жирные кислоты) и гликогена (построенного из глюкозы).
- Г. Правильно.
- Д. Неправильно. При транспорте электронов протоны выкачиваются из митохондриального матрикса в межмембранное пространство.
- Е. Правильно.
- Ж. Правильно.
- З. Неправильно, АТФ-синтаза ориентирована во внутренней мембране так, что АТФ синтезируется в матриксе, после чего выносятся из матрикса ADP/АТФ-транслоказой, действующей по принципу антипорта.
- И. Неправильно. Легче протекают реакции с отрицательным значением ΔG , т. е. те, которые сопровождаются уменьшением свободной энергии.
- К. Правильно.

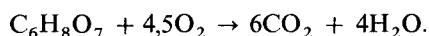
7-3 Результат, полученный Кнопом, на первый взгляд кажется удивительным. Можно было бы полагать, что метаболизирование жирных кислот до CO_2 заключается в отделении CO_2 от конца цепи и следующем затем окислении нового конечного углеродного атома, чтобы и он мог отделиться в виде CO_2 . Однако предположение об удалении одноуглеродных единиц не согласуется с результатами Кнопа, поскольку из него следует, что жирные кислоты с нечетным и четным числом атомов углерода должны давать один и тот же конечный продукт. Не соответствуют полученные данные и отщеплению фрагментов, состоящих более, чем из двух углеродных атомов. Например, отщепление трехуглеродных фрагментов могло бы происходить в случае восьми- или семиуглеродных жирных кислот, как показано на рис. 7-1, но не в случае шести- или пятиуглеродных жирных кислот.

Наблюдавшееся различие в метаболизме жирных кислот с четным и нечетным числом атомов углерода можно объяснить только отщеплением двууглеродных фрагментов от карбоксильного конца жирной кислоты. Возникает вопрос: почему последний двууглеродный фрагмент не отщеплялся от фенилуксусной кислоты? На процесс деградации, который включает модификацию третьего от карбоксильного конца атома углерода, влияет бензольное кольцо. Поскольку в фенилуксусной кислоте этот атом углерода является частью бензольного кольца, он защищен от модификации, и расщепления фенилуксусной кислоты не происходит.

Результаты Кнопа указывают также на последовательность деградации. А именно на то, что процесс начинается с карбоксильного конца, иначе бензольное кольцо должно было делать жирные кислоты устойчивыми к расщеплению либо во всех случаях выделялось бы одно и то же вещество.

7-4

A. Полное окисление лимонной кислоты до CO_2 и H_2O происходит согласно следующей равновесной химической реакции:



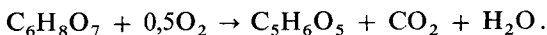
Таким образом, для полного окисления каждой молекулы цитрата требуется 4,5 молекулы кислорода.

Результаты, представленные в таблице 7-1, в свое время удивляли Кребса и других ученых, так как в ходе этой реакции поглощалось гораздо больше кислорода (40 ммоль), чем могло бы требоваться для окисления собственно цитрата. Только 13,5 ммоль кислорода требуется для полного окисления 3 ммоль цитрата ($3 \times 4,5$). Этот расчет показывает, что лимонная кислота служит катализатором при окислении углеводов (в данных опытах это были эндогенные углеводы измельченных грудных мышц голубя). О каталитической роли других промежуточных соединений было известно и раньше. Однако Кребс был первым, кто объяснил это, предположив существование замкнутого цикла химических реакций, известного под названием цикла лимонной кислоты.

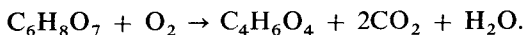
Экспериментальное доказательство этого Кребс ясно изложил в своей статье. Он писал: «Поскольку лимонная кислота действует в ткани как катализатор, то, вероятно, на первой стадии реакции она превращается в другое соединение, а затем вновь восстанавливается в следующей реакции. В итоге этих реакций цитрат, следовательно, не исчезает и накопления промежуточных продуктов не происходит. Для изучения последних нужно поэтому в первую очередь найти условия, при которых цитрат исчезает из системы».

- Б. В присутствии ингибиторов метаболизма потребление кислорода находится на низком уровне, поскольку они препятствуют каталитическому действию цитрата. Величина поглощения, рассчитанная из уравнения реакции превращения цитрата в α -кетоглутарат и сукцинат, приблизительно соответствует количеству реально поглощаемого кислорода.

Для превращения цитрата в α -кетоглутарат нужно $1/2$ моль кислорода:



Для превращения цитрата в сукцинат требуется один моль кислорода:



Таким образом, наблюдаемая стехиометрия потребления кислорода соответствует расчетной.

- В. Отсутствие кислорода — это фактор, необходимый для демонстрации накопления цитрата, образующегося в цикле из промежуточного продукта. В присутствии кислорода цитрат действует как катализатор — сначала расходуется, а затем вновь образуется, так что он не накапливается, даже если добавить промежуточное соединение. В отсутствие кислорода превращение цитрата в α -кетоглутарат блокируется, поскольку для этой реакции нужен кислород. Поэтому в анаэробных условиях и в присутствии соответствующего промежуточного соединения цитрат накапливается. Из всех реакций цикла только для превращения щавелевоуксусной кислоты (ЩУК) в лимонную не нужен кислород. Непосредственным предшественником ЩУК является яблочная кислота. Поскольку для превращения последней в цитрат нужен кислород, то и для превращения всех других промежуточных соединений в цитрат также необходим кислород. (Это косвенная потребность, опосредованная кофакторами: NAD^+ и FAD , которые принимают электроны от субстратов и передают их в электронтранспортную цепь и в конечном итоге на кислород.)

На основе этих соображений можно было бы ожидать количественного превращения ЩУК в лимонную кислоту. Однако в опытах Кребса при добавлении 300 ммоль ЩУК накапливалось только 13 ммоль лимонной кислоты. Обстоятельство, которого не знал Кребс, заключается в том, что лимонная кислота образуется в результате присоединения ацетил- CoA , еще не открытого к тому времени, к щавелевоуксусной кислоте. Образование же ацетил- CoA из его непосредственного предшественника, пировиноградной кислоты, зависит от кислорода.

- Г. В клетках *E. coli* и дрожжей цикл лимонной кислоты на самом деле функционирует.

Кребс ошибался в этом вопросе, поскольку не подозревал (как и другие ученые в течение длительного времени), что цитрат не может поглощаться этими клетками. Именно из-за того, что не происходило поглощения цитрата, Кребс не наблюдал стимуляции потребления O_2 , когда добавлял цитрат к интактным клеткам *E. coli* или дрожжей. Чтобы цитрат проходил через мембрану, нужна мембранная транспортная система, которая есть в митохондриях, но отсутствует у дрожжей и у *E. coli*.

Литература: Krebs, H. A., Johnson, W. A. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *Enzymologia* 4: 148–156, 1937.

7-5

- А. Если концентрации реагирующих веществ и продуктов реакции одинаковы и равны 1 М, то реакция считается протекающей при стандартных условиях, а величина ΔG равна величине ΔG^0 и составляет $-7,3$ ккал/моль.

$$\begin{aligned}\Delta G &= \Delta G^0 + 2,3RT \log_{10} \frac{[\text{ADP}][\text{P}_i]}{[\text{ATP}]} = \\ &= -7,3 \text{ ккал/моль} + 2,3 (0,00198 \text{ ккал/К} \times \text{моль}) \times \\ &\quad \times (310 \text{ К}) \times \log_{10} \frac{1 \times 1}{1}.\end{aligned}$$

Поскольку $\log_{10} 1$ равен 0,

$$\Delta G = -7,3 \text{ ккал/моль}.$$

Если концентрации реагирующих веществ и продуктов реакции равны 1 мМ, ΔG составляет $-11,5$ ккал/моль.

$$\begin{aligned}\Delta G &= -7,3 \text{ ккал/моль} + (1,4 \text{ ккал/моль}) \log_{10} \frac{10^{-3} \times 10^{-3}}{10^{-3}} \\ &= -7,3 \text{ ккал/моль} + (1,4 \text{ ккал/моль}) (-3) \\ &= -7,3 \text{ ккал/моль} - 4,2 \text{ ккал/моль} \\ \Delta G &= -11,5 \text{ ккал/моль}.\end{aligned}$$

- Б. При данных концентрациях АТР, АДР и P_i , значение ΔG при гидролизе АТР составляет $-11,1$ ккал/моль.

$$\begin{aligned}\Delta G &= -7,3 \text{ ккал/моль} + (1,4 \text{ ккал/моль}) \log_{10} \frac{(0,001)(0,010)}{(0,005)} \\ &= -7,3 \text{ ккал/моль} + (1,4 \text{ ккал/моль}) (-2,7) \\ &= -7,3 \text{ ккал/моль} - 3,8 \text{ ккал/моль} \\ \Delta G &= -11,1 \text{ ккал/моль}.\end{aligned}$$

- В. При равновесии величина ΔG равна 0. Если $[\text{P}_i]$ при равновесии равна 10 мМ, то отношение $[\text{АТР}]$ к $[\text{АДР}]$ будет равно $6,1 \times 10^{-8}$.

$$\begin{aligned}0 &= -7,3 \text{ ккал/моль} + (1,4 \text{ ккал/моль}) \log_{10} \frac{[\text{АДР}] \times (0,01)}{[\text{АТР}]} \\ 7,3 \text{ ккал/моль} &= (1,4 \text{ ккал/моль}) (\log_{10} 0,01 + \log_{10} [\text{АДР}]/[\text{АТР}]) \\ &= (-2)(1,4 \text{ ккал/моль}) + (1,4 \text{ ккал/моль}) \log_{10} [\text{АДР}]/[\text{АТР}] \\ \log_{10} [\text{АДР}]/[\text{АТР}] &= \frac{10,1 \text{ ккал/моль}}{1,4 \text{ ккал/моль}} \\ &= 7,2 \\ \log_{10} [\text{АТР}]/[\text{АДР}] &= -7,2, \\ [\text{АТР}]/[\text{АДР}] &= 6,1 \times 10^{-8}.\end{aligned}$$

- Г. При постоянстве $[\text{P}_i]$ каждое изменение в 10 раз отношения $[\text{АТР}]/[\text{АДР}]$ сопровождается изменением ΔG на 1,4 ккал/моль. Как показано далее, десятикратное увеличение отношения $[\text{АТР}]/[\text{АДР}]$ приводит к уменьшению ΔG на 1,4 ккал/моль.

$$\begin{aligned}\Delta G &= \Delta G^0 + (1,4 \text{ ккал/моль}) \log_{10} \frac{[\text{АДР}][\text{P}_i]}{[\text{АТР}]} \\ &= \Delta G^0 + 1,4 \text{ ккал/моль} \cdot \log_{10} [\text{P}_i] + (1,4 \text{ ккал/моль}) \log_{10} \frac{[\text{АДР}]}{[\text{АТР}]}\end{aligned}$$

Десятикратное увеличение отношения $[\text{АТР}]/[\text{АДР}]$ или, что то

же самое, десятикратное уменьшение отношения $[ADP]/[ATP]$ приводит к уменьшению $\log_{10}$ последнего отношения на -1 . Таким образом, каждое десятикратное увеличение отношения $[ATP]/[ADP]$ должно приводить к уменьшению величины ΔG на $1,4$ ккал/моль. Стократное увеличение отношения $[ATP]/[ADP]$ снижает ΔG на $2,8$ ккал/моль; 1000-кратное увеличение этого отношения снижает ΔG на $4,2$ ккал/моль.

7-6

- А. Поскольку имеется только одно реагирующее вещество и один продукт, то отношение их равновесных концентраций не должно изменяться:

$$K = \frac{[2\text{-фосфоглицерат}]}{[3\text{-фосфоглицерат}]}$$

$$K [3\text{-фосфоглицерат}] = [2\text{-фосфоглицерат}].$$

Таким образом, концентрация 2-фосфоглицерата регулируется константой равновесия. Какое бы количество 3-фосфоглицерата ни добавляли, постоянная его часть превращается в 2-фосфоглицерат, так что при равновесии отношение концентраций должно оставаться неизменным.

Величина K равна $1,7 \text{ мМ}/8,3 \text{ мМ}$ или $0,20$.

ΔG^0 для этой реакции равно

$$\begin{aligned}\Delta G^0 &= -2,3RT \log_{10} K = -2,3RT \log_{10} \frac{[2\text{-фосфоглицерат}]}{[3\text{-фосфоглицерат}]} = \\ &= (-1,4 \text{ ккал/моль}) \log_{10} \frac{1,7}{8,3},\end{aligned}$$

$$\Delta G^0 = 0,96 \text{ ккал/моль}.$$

- Б. Для реакции

фосфоенолпируват $\rightarrow$ 2-фосфоглицерат

константа равновесия равна

$$K = \frac{[2\text{-фосфоглицерат}]}{[\text{фосфоенолпируват}]},$$

и изменение стандартной свободной энергии будет равно

$$\begin{aligned}\Delta G^0 &= -2,3RT \log_{10} \frac{[2\text{-фосфоглицерат}]}{[\text{фосфоенолпируват}]} = \\ &= (-1,4 \text{ ккал/моль}) \log_{10} \frac{2,9}{7,1}\end{aligned}$$

$$\Delta G^0 = 0,54 \text{ ккал/моль}.$$

Для обратной реакции

2-фосфоглицерат $\rightarrow$ фосфоенолпируват

константа равновесия равна

$$K = \frac{[\text{фосфоенолпируват}]}{[2\text{-фосфоглицерат}]}$$

и изменение стандартной свободной энергии будет равно

$$\Delta G^0 = (-1,4 \text{ ккал/моль}) \log_{10} \frac{7,1}{2,9},$$

$$\Delta G^0 = -0,54 \text{ ккал/моль.}$$

Таким образом, изменения стандартной свободной энергии для прямой и обратной реакций равны по величине и противоположны по знаку.

- В. Величина ΔG^0 для суммарной реакции равна сумме величин ΔG^0 для отдельных его этапов; однако величины ΔG^0 должны относиться к соответствующему направлению реакции (т.е. направления отдельных реакций и суммарной реакции должны быть одинаковыми). Для превращения 3-фосфоглицерата (3ФГ) в фосфоенолпируват (ФЕП):

$$\begin{aligned}\Delta G_{3\text{ФГ} \rightarrow \text{ФЕП}}^0 &= \Delta G_{3\text{ФГ} \rightarrow 2\text{ФГ}}^0 + \Delta G_{2\text{ФГ} \rightarrow \text{ФЕП}}^0 = \\ &= 0,96 \text{ ккал/моль} + (-0,54 \text{ ккал/моль}) \\ \Delta G_{3\text{ФГ} \rightarrow \text{ФЕП}}^0 &= 0,42 \text{ ккал/моль.}\end{aligned}$$

7-7

- А. Величина ΔG^0 для процесса превращения 3-фосфоглицерата (3ФГ) в пируват (ПВ) и фосфат является суммой ΔG^0 для отдельных его этапов:

$$\begin{aligned}\Delta G_{3\text{ФГ} \rightarrow \text{ПВ}}^0 &= \Delta G_{3\text{ФГ} \rightarrow \text{ФЕП}}^0 + \Delta G_{\text{ФЕП} \rightarrow \text{ПВ}}^0 \\ &= 0,4 \text{ ккал/моль} + (-14,8 \text{ ккал/моль}), \\ \Delta G_{3\text{ФГ} \rightarrow \text{ПВ}}^0 &= -14,4 \text{ ккал/моль.}\end{aligned}$$

- Б. Величина ΔG^0 для превращения 3ФГ в пируват и фосфат не зависит от пути этого превращения. Таким образом, $\Delta G^0 = -14,4$ ккал/моль. Величину ΔG^0 для превращения глицерата в ПВК можно рассчитать путем вычитания ΔG^0 для реакции превращения 3-фосфоглицерата в глицерат (Г) из суммарного ΔG^0 :

$$\begin{aligned}\Delta G_{\text{Г} \rightarrow \text{ПВ}}^0 &= \Delta G_{3\text{ФГ} \rightarrow \text{ПВ}}^0 - \Delta G_{3\text{ФГ} \rightarrow \text{Г}}^0 \\ &= -14,4 \text{ ккал/моль} - (-3,3 \text{ ккал/моль}), \\ \Delta G_{\text{Г} \rightarrow \text{ПВ}}^0 &= -11,1 \text{ ккал/моль.}\end{aligned}$$

- В. Проведенный выше анализ показывает, что в реакции превращения глицерата в пируват изменение стандартной свободной энергии очень велико. Удаление воды ($\Delta G^0 = -0,5$ ккал/моль) не вносит большого вклада в это изменение. Таким образом, превращение енолпирувата (ЕПВК) в пируват сопровождается, по видимому, большим изменением стандартной свободной энергии ($-10,6$ ккал/моль). Из приведенного здесь обсуждения следует, что большая часть изменения стандартной свободной энергии в реакции превращения фосфоенолпирувата в пируват ($-10,6$ ккал/моль из $-14,8$ ккал/моль) относится к превращению енолпирувата в пируват и не связана с гидролизом фосфатной связи.

Действительно, величина изменения стандартной свободной энергии в реакции превращения фосфоенолпирувата в пируват ($-14,8$ ккал/моль) близка к сумме следующих изменений: изменение свободной энергии в реакции превращения енолпирувата в пируват (около -11 ккал/моль) и обычное изменение стандартной свободной энергии при гидролизе простой эфирной связи, присоединяющей остаток фосфорной кислоты (около $-3,0$ ккал/моль). Таким образом, фосфатная связь в фосфоенолпирувате является макроэргической, потому что ее гидролиз связан с термодинамически выгодным превращением енолпирувата в пируват.

- Г. Величина ΔG^0 для сопряженных превращений фосфоенолпирувата в пируват и ADP в АТФ равна $-7,5$ ккал/моль. Ее можно

вычислить путем сложения величин ΔG^0 отдельных реакций:
 фосфоенолпируват $\rightarrow$ пируват + P_i $\Delta G^0 = -14,8$ ккал/моль,
 $ADP + P_i \rightarrow ATP$ $\Delta G^0 = 7,3$ ккал/моль.

Итого: ФЕП + ADP $\rightarrow$ ПВ + ATP

$$\Delta G_{\text{ФЕП} + \text{ADP} \rightarrow \text{ПВ} + \text{ATP}}^0 = \Delta G_{\text{ФЕП} \rightarrow \text{ПВ}}^0 + \Delta G_{\text{ADP} \rightarrow \text{ATP}}^0$$

$$= -14,8 \text{ ккал/моль} + 7,3 \text{ ккал/моль}$$

$$\Delta G_{\text{ФЕП} + \text{ADP} \rightarrow \text{ПВ} + \text{ATP}}^0 = -7,5 \text{ ккал/моль.}$$

Литература: *Lipmann, F.* Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Adv. Enzymol.* 1:99-162, 1941.

- 7-8** Ключ к пониманию этих результатов состоит в том, что реакция обмена ADP на ATP электрически не нейтральна. ATP несет четыре отрицательных заряда, а ADP — только три отрицательных заряда (рис. 7-4). В результате каждый обмен ADP на ATP приводит к возникновению отрицательного заряда на той стороне мембраны, которая получает ATP. В дышащей митохондрии существует электрохимический протонный градиент на внутренней митохондриальной мембране, в соответствии с которым наружная сторона заряжена положительно. Результирующая протондвижущая сила обеспечивает обмен ADP из цитоплазмы на ATP, находящуюся внутри митохондрий, что связано с уменьшением положительного заряда на внешней стороне внутренней мембраны. Результаты ваших опытов говорят о том, что обмен наружной ADP происходит в большей степени, чем обмен наружной ATP, в условиях, когда мембрана заряжена: если в среде присутствует субстрат и нет ингибитора или если присутствуют субстрат и ингибитор ATP-синтетазы (табл. 7-2, опыты 2 и 4). Когда электрохимический протонный градиент отсутствует, а именно когда нет субстрата или когда градиент разрушается из-за того, что мембрана становится проницаемой для протонов, ADP и ATP обмениваются с одинаковыми скоростями (табл. 7-2, опыты 1 и 3).

Электрогенная природа ADP/ATP-антипорта имеет важные физиологические последствия. По-существу при этом обмене энергия электрохимического протонного градиента используется как движущая сила для осуществления транспорта, благодаря которому отношение ATP/ADP в цитозоле остается высоким (до 50). Такая разница в концентрациях этих нуклеотидов обуславливает до одной трети изменения свободной энергии (ΔG) при гидролизе ATP в цитоплазме.

Литература: *Nicholls, D.G.* Bioenergetics, pp. 159-164. London: Academic Press, 1982.

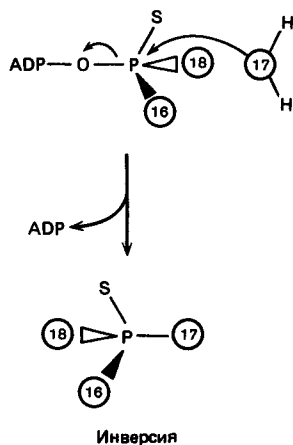
Tzagoloff, A. Mitochondria, pp. 212-213. New York: Plenum Press, 1982.

Дыхательная цепь и ATP-синтетаза

7-9

- А. ATP-синтетаза
- Б. цитохромы
- В. железосерный центр
- Г. хиноны
- Д. ферментные комплексы дыхательной цепи
- Е. комплекс NADH-дегидрогеназы
- Ж. комплекс $b-c_1$

А. Одноступенчатый механизм



Б. Двухступенчатый механизм

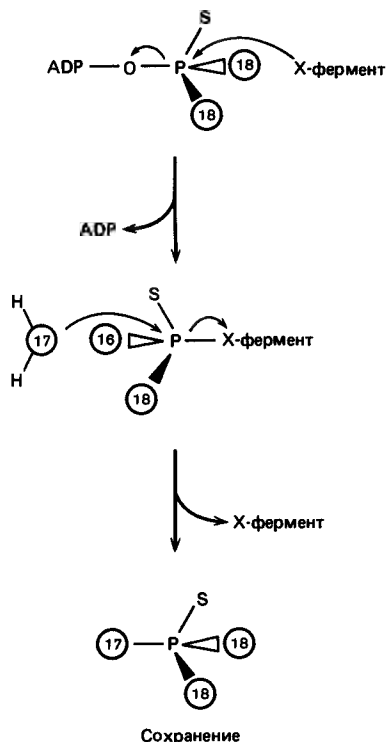


Рис. 7-25. Стереохимическая схема реакций гидролиза АТФ по одноступенчатому (А) и двухступенчатому (Б) механизмам (ответ 7-11).

- З. комплекс цитохромоксидазы
- И. сопряженные окислительно-восстановительные пары
- К. редокс-потенциал (окислительно-восстановительный потенциал)
- Л. дыхательный контроль

7-10

- А. Правильно.
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. АТФ-синтетаза представляет собой ферментный комплекс с обратимым действием. Направление его действия зависит от соотношения между величинами электрохимического протонного градиента и локального ΔG для гидролиза АТФ.
- Г. Правильно. (Субмитохондриальные частицы представляют собой вывернутые наизнанку мембраны, поэтому протоны закачиваются в везикулы, что приводит к подщелочению среды.)
- Д. Неправильно. Хотя в большинстве белков дыхательной цепи роль переносчиков электронов выполняют атомы железа, однако в одном белке в этом качестве выступает молекула флавина, а в двух белках – атомы меди.
- Е. Правильно.
- Ж. Неправильно. Три дыхательных ферментных комплекса, по-видимому, существуют как независимые единицы, расположенные в плоскости внутренней мембраны, упорядоченный же перенос электронов происходит только за счет специфических функциональных взаимодействий между компонентами цепи.
- З. Правильно.
- И. Правильно.
- К. Неправильно. Слабые липофильные кислоты действуют как разобщающие агенты, которые разрушают протондвижущую силу и блокируют синтез АТФ; однако они усиливают поток электронов через дыхательную цепь за счет того, что снимают дыхательный контроль, осуществляемый электрохимическим протонным градиентом.
- Л. Правильно.
- М. Правильно.
- Н. Правильно.

7-11

- А. Это тонкий эксперимент, позволяющий определить, какой механизм действует: с переносом одной фосфатной группы или с переносом двух фосфатных групп. Так как перенос каждой фосфатной группы ведет к инверсии структуры относительно атома фосфора, то механизм одноступенчатого переноса приводит к такой инверсии, а механизм двухступенчатого переноса – к возврату исходной конфигурации (инверсия после инверсии приводит к возвращению в исходное состояние). Как показано на рис. 7-25, прямое взаимодействие АТФ с молекулой воды, в результате которого образуются АДФ и фосфат, является одноступенчатым процессом, приводящим к инверсии конфигурации. Гидролиз АТФ через промежуточное фосфорилированное соединение представляет собой двухступенчатый механизм, а следовательно, конфигурация фосфата должна возвратиться к исходной форме. (Заметьте, что этот результат, однако, не позволяет провести различия между одноступенчатым механизмом и механизмами, включающими три или любое другое нечетное число переносов фосфата.)
- Б. Инверсия конфигурации при гидролизе АТФ под действием АТФ-синтетазы указывает на то, что механизм реакции не включает два

переноса. Следовательно, здесь не требуется привлечения модели с фосфорилированным интермедиатом. Таким образом, при гидролизе аденозинтрифосфата АТР-синтетазой происходит, вероятно, прямое взаимодействие АТР с водой (H_2O). Если гидролиз представляет собой обращение реакции синтеза (по-видимому, это именно так и есть), то синтез АТР из АДФ и фосфата также должен протекать прямо, без каких-либо гипотетических фосфорилированных интермедиатов. (Механизм, включающий три переноса фосфата, при этом не исключается но он, по-видимому, гораздо менее вероятен.)

Литература: Webb, M. R., Grubmeyer, C., Penefsky, H. S., Trentham, D. R. The stereochemical course of phosphoric residue transfer catalyzed by beef heart mitochondrial ATPase. J. Biol. Chem. 255:11637–11639, 1980.

7-12

А. Кислород получает электроны из электронтранспортной цепи и восстанавливается до H_2O . Следовательно, в присутствии кислорода цитохромы должны освобождаться от своих электронов, т.е. окисляться. В присутствии кислорода полос поглощения не наблюдается, следовательно, окисленные формы не поглощают свет. Восстановленные формы цитохромов поглощают свет и дают характерные полосы поглощения. В отсутствие кислорода цитохромы принимают электроны от субстратов (становятся восстановленными), но не могут передать их на кислород. В присутствии кислорода происходит эффективный перенос электронов, в результате которого цитохромы переходят в окисленную форму, бедную электронами.

Б. Наблюдения Кейлина указывают на то, что порядок движения электронов по цепи цитохромов должен быть следующим:

восстановленные $\longrightarrow$ цитохром $b \rightarrow$ цитохром $c \rightarrow$
субстраты

— цитохром $a \rightarrow O_2$.

Полосы поглощения появляются в отсутствие кислорода, следовательно, они соответствуют восстановленным формам цитохромов (богатых электронами). При добавлении кислорода цитохромы переходят в окисленную форму (бедную электронами). При добавлении цианида все цитохромы восстанавливаются, что свидетельствует о блокировании этим соединением потока электронов от цитохромов к кислороду; т.е. все цитохромы располагаются до кислорода в цепи транспорта электронов.

При добавлении уретана цитохром b остается восстановленным, но цитохромы a и c окисляются. Таким образом, уретан нарушает поток электронов от цитохрома b к цитохромам a и c , из чего следует, что цитохром b располагается перед цитохромами a и c .

Эти результаты показывают, что либо цитохром a , либо цитохром c переносят электроны на кислород. Тот факт, что кислород не окисляет препарат цитохрома c , позволяет предполагать, что ответственным за перенос электронов непосредственно на кислород может быть цитохром a . Однако вывод о таком порядке функционирования цитохромов a и c представляется недостаточно убедительным, поскольку основан на одном отрицательном результате (который можно интерпретировать и по-другому). Кейлин сам доказал, что существует именно такой порядок, на основании данных о тонких спектральных сдвигах в полосе цитохрома a в присутствии цианида при восстановительных условиях; он

назвал активный компонент этого цитохрома цитохромом a_3 . Теперь мы знаем, что цитохром a — это крупный комплекс с несколькими редокс-центрами, один из которых взаимодействует с молекулярным кислородом.

- В. Быстрое окисление глюкозы до CO_2 препятствует исчезновению полос поглощения, поскольку служит источником восстановленных субстратов (таких, как NADH и FADH_2), которые поставляют электроны в электронтранспортную цепь быстрее, чем те могут быть связаны кислородом. В таких условиях цитохромы находятся в восстановленной (богатой электронами) форме и, следовательно, продолжают поглощать свет.

Литература: Keilin, D. The History of Cell Respiration and Cytochrome. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 1966.

- 7-13 Эксперименты с модификацией отдельных остатков лизина показывают, что все остатки лизина важны для переноса электронов на цитохром c и от него. Одна из возможных причин подавления, в результате таких модификаций, транспорта электронов это влияние их на связывание цитохрома c с обоими комплексами. Такое объяснение подтверждается теми экспериментами, в которых показано, что одни и те же лизины защищены от модификации, когда цитохром c связан с комплексом $b-c_1$ и когда он связан с комплексом цитохромоксидазы.

Результаты этих двух экспериментов показывают, что одни и те же остатки лизина в цитохроме c взаимодействуют с комплексом $b-c_1$ и с комплексом цитохромоксидазы. Если одни и те же остатки лизина участвуют во взаимодействии с обоими комплексами, то цитохром c не может связываться одновременно с двумя комплексами (а следовательно, не может действовать по механизму проволоочной связи). Следовательно, цитохром c должен взаимодействовать с этими комплексами по отдельности, т. е. служить челночным переносчиком электронов.

Литература: Smith, H. T., Ahmed, A. J., Millet, F. Electrostatic interaction of cytochrome c with cytochrome c_1 and cytochrome oxidase. J. Biol. Chem. 256, 4984–4990, 1981.

Capaldi, R. A., Darley-USmar, V., Fuller, S., Millet, F. Structural and functional features of the interaction of cytochrome c with complex III and cytochrome c oxidase. FEBS Letters 138, 1–7, 1982.

7-14

- А. Скорость поглощения кислорода определяется скоростью транспорта электронов в дыхательной цепи. Транспорт электронов генерирует электрохимический протонный градиент, направленный против потока электронов. Если возможность диссипации этого градиента отсутствует, поток электронов в конце концов должен прекратиться, когда давление электронов уравнивается противоположный по направлению электрохимический протонный градиент. В опыте, проиллюстрированном на рис. 7-9, электрохимический протонный градиент диссипирует с низкой фоновой скоростью, чем можно объяснить низкую фоновую скорость потребления кислорода. Добавление ADP и последующее его превращение в АТФ вызывают вход протонов назад в митохондрии, что приводит к резкому снижению электрохимического протонного градиента и быстрому транспорту электронов на кислород. Ускорение транспорта электронов способствует увеличению скорости потребления кислорода. После полного превращения ADP в АТФ поток протонов внутрь митохондрий вновь

снижается до фонового уровня, а возросший электрохимический протонный градиент опять начинает тормозить поток электронов.

Б. Низкая фоновая скорость потребления кислорода митохондриями в отсутствие экзогенного ADP свидетельствует о том, что транспорт электронов на кислород по электронтранспортной цепи продолжается, хотя синтез АТФ не происходит. Транспорт может продолжаться лишь в том случае, если электрохимический протонный градиент медленно диссипирует. Если бы внутренняя мембрана митохондрии была полностью непроницаемой для протонов, скорость потребления кислорода должна была упасть до нуля, когда накачивание протонов за счет транспорта электронов уравновесилось бы обратным давлением электрохимического протонного градиента. Этого не происходит, следовательно, протоны должны проходить через мембрану в отсутствие синтеза АТФ.

Кроме синтеза АТФ из ADP некоторые другие процессы также могут обеспечивать слабый поток протонов через мембрану.

1. Внутренняя мембрана митохондрий не полностью непроницаема для протонов, они могут медленно проходить сквозь мембрану даже в отсутствие синтеза АТФ.
 2. Имеющийся внутри митохондрий АТФ может гидролизироваться до ADP, а затем вновь превращаться в АТФ за счет протондвижущей силы.
 3. Если некоторые митохондрии в препарате повреждаются в процессе его приготовления, так что их внутренние мембраны перестают быть интактными, они начинают осуществлять транспорт электронов на кислород непрерывно, поскольку электрохимического протонного градиента, направленного противоположно потоку электронов, в этом случае не возникает.
- В. Поскольку каждая пара электронов, проходящих по дыхательной цепи от NADH к кислороду, восстанавливает один атом кислорода, то отношение $P/2e^-$ эквивалентно отношению P/O . Это отношение, как будет показано далее, находится в пределах 2,5–2,8 молекул АТФ на 1 атом кислорода. Неопределенность величины P/O (или $P/2e^-$) происходит из-за неопределенности в том, сколько атомов кислорода поглощено в ходе превращения 500 нмоль ADP в АТФ. Если потребление кислорода рассчитывать по разнице между количествами O_2 , указываемыми штриховыми линиями на рис. 7-9 (она составляет 100 нмоль O_2), то отношение P/O будет равно 500 нмоль АТФ/200 нмоль O , т.е. 2,5. С другой стороны, если потребление кислорода рассчитывать по разнице между значениями, указываемыми пунктирными линиями на рис. 7-9 (она составляет 90 нмоль O_2), то отношение P/O будет равняться 500 нмоль АТФ/180 нмоль O , т.е. 2,8. В последнем случае расчет основан на допущении, что фоновая скорость потребления кислорода сохраняется в ходе превращения ADP в АТФ, что вполне резонно. Оказывается, однако, что медленный естественный поток протонов через интактные внутренние мембраны очень чувствителен к величине электрохимического протонного градиента. Слабое снижение величины протондвижущей силы в процессе синтеза АТФ может привести к тому, что утечка снизится почти до нуля, тогда большая величина потребления кислорода может быть более правильной и отношение P/O будет равно 2,5.
- Г. В экспериментах такого типа наряду с синтезом АТФ еще ряд процессов приводится в действие электрохимическим протонным градиентом. Для поглощения субстрата (β -гидроксимасляная кислота) митохондриями может быть необходим симпорт с

протонами. Поступление фосфата в митохондрии также происходит по механизму симпорта с протонами. Наконец, обмен внутреннего АТР на наружный АДФ поддерживается за счет мембранного потенциала, являющегося одним из компонентов электрохимического протонного градиента. Поскольку от этого градиента зависит несколько процессов одновременно, не приходится удивляться, что отношение Р/О не равно целому числу. До появления хемиосмотической теории, когда были в моде гипотезы химического сопряжения, считалось, что эти величины должны быть целыми. Поэтому предполагалось, что такие значения, как 2,5 или 2,8, указывают на истинную величину 3.

Литература: Nicholls, D. G., Bioenergetics, London: Academic Press, 1982.

7-15

- А. Кривую поглощения кислорода, показанную на рис. 7-10, А, можно получить при добавлении малоната, цианида или бутилмалоната. Каждый из этих ингибиторов блокирует поток электронов к кислороду, останавливая тем самым его поглощение. Бутилмалонат и малонат блокируют поглощение и окисление сукцината соответственно, перекрывая тем самым поток электронов в самом его начале. Цианид останавливает поток электронов на уровне цитохромоксидазы, которая в норме переносит электроны непосредственно на кислород.

Кривой поглощения кислорода, показанной на рис. 7-10, Б, соответствуют атрактил и олигомицин. Блокируя обмен АДФ на АТР, атрактил препятствует входу АДФ в митохондрии и последующему синтезу АТР. В результате такого «отлучения» АДФ скорость дыхания снижается до уровня, предшествовавшего добавлению АДФ. Олигомицин, подавляя АТР-синтазу, тоже по существу выводит АДФ из системы, и скорость дыхания возвращается к той величине, которая была перед добавлением АДФ.

Кривая поглощения кислорода на рис. 7-10, В показывает эффект добавления FCCP. Делая внутреннюю мембрану проницаемой для протонов, FCCP разобщает транспорт электронов и окислительное фосфорилирование, обеспечивая тем самым максимальную скорость прохождения электронов по дыхательной цепи к кислороду (так как ему не противодействует электрохимический протонный градиент).

- Б. Кривые поглощения кислорода митохондриями, соответствующие трем комбинациям ингибиторов, показаны на рис. 7-26. FCCP разобщает поток электронов и окислительное фосфорилирование, способствуя достижению максимальной скорости переноса электронов и максимальной скорости поглощения кислорода. Последующее добавление цианида приводит к блокированию непосредственно транспорта электронов и тем самым к прекращению поглощения кислорода (рис. 7-26, А).

Поскольку FCCP разобщает поток электронов и окислительное фосфорилирование, олигомицин (который подавляет АТР-синтазу) не оказывает влияния на скорость поглощения кислорода (рис. 7-26, В).

Олигомицин снижает скорость потребления кислорода, блокируя АТР-синтазу. Этот эффект ослабляется при добавлении FCCP, потому что последний разобщает транспорт электронов и окислительное фосфорилирование (рис. 7-26, В).

Литература: Nicholls, D. G., Bioenergetics, pp. 86, 110. London: Academic Press, 1982.

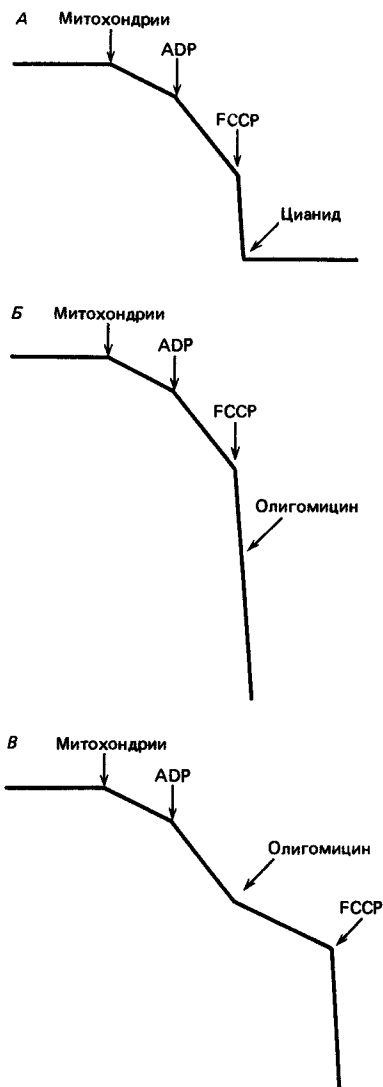


Рис. 7-26. Кривые выделения кислорода, ожидаемые для трех комбинаций ингибиторов (ответ 7-15). А. FCCP с последующим добавлением цианида. Б. FCCP с последующим добавлением олигомицина. В. Олигомицин с последующим добавлением FCCP.

7-16

- А. Да, следует ожидать, что действие 2,4-динитрофенола на митохондрии будет аналогично действию TCS на метанобразующие бактерии. Добавление 2,4-динитрофенола к митохондриям приводит к прекращению образования АТФ, но образование CO_2 в цикле лимонной кислоты при этом продолжается. Образование АТФ останавливается из-за того, что протондвижущая сила, которая приводит в действие синтез АТФ, отсутствует, когда разрушен электрохимический протонный градиент. Образование CO_2 даже слегка стимулируется, потому что электроны могут свободно переноситься по цепи электронного транспорта (их потоку больше не противодействует электрохимический протонный градиент). Действие 2,4-динитрофенола на митохондрии совершенно аналогично действию TCS на метанобразующие бактерии: TCS останавливает синтез АТФ, но при этом открывает возможность свободного потока электронов, что приводит к стимуляции образования CH_4 .
- Б. Да, следует ожидать, что олигомицин действует на митохондрии аналогично тому, как действует DCCD на метаногенез. Олигомицин ингибирует образование CO_2 в митохондриях, не затрагивая электрохимического протонного градиента. Блокируя АТФ-синтетазу, олигомицин препятствует разрядке электрохимического протонного градиента обычным образом, т.е. путем осуществления синтеза АТФ. Обратное давление, создаваемое статическим электрохимическим протонным градиентом, ингибирует электронный поток, потому что последний связан с транспортом протонов. Действие олигомицина на митохондрии совершенно аналогично влиянию DCCD на метаногенез: DCCD останавливает образование АТФ, ингибируя АТФ-синтетазу и тем самым как бы замораживая электрохимический протонный градиент, который ослабляет поток электронов и ингибирует образование CH_4 .
- В. Да, следует ожидать, что добавление 2,4-динитрофенола к митохондриям, ингибированным олигомицином, приведет к эффекту, аналогичному тому, который вызывается добавлением TCS к метанобразующим бактериям в условиях, когда выделение CH_4 подавлено с помощью DCCD. Образование CO_2 в митохондриях, обработанных олигомицином, стимулируется 2,4-динитрофенолом. В таких митохондриях действует статический электрохимический протонный градиент, который уменьшает электронный поток и ингибирует образование CO_2 . При добавлении 2,4-динитрофенола электрохимический протонный градиент разрушается, что позволяет электронам снова свободно проходить по электронтранспортной цепи. Свободный поток электронов (к O_2 с образованием воды) способствует дальнейшему окислению субстратов до CO_2 . Такое действие 2,4-динитрофенола на митохондрии, подавленные олигомицином, полностью аналогично эффекту добавления TCS к метанобразующим бактериям при действии на них DCCD: TCS поддерживает поток электронов, разрушая статический электрохимический протонный градиент и тем самым способствуя восстановлению метанола до метана.
- Г. Идентичное действие одних и тех же ингибиторов на митохондрии и метанобразующие бактерии очень убедительно свидетельствует в пользу предположения, что у метанобразующих бактерий АТФ синтезируется путем фосфорилирования, обеспечиваемого электронным транспортом.

Литература: Blaut, M., Gottschalk, G. Evidence for a chemiosmotic mechanism of ATP synthesis in methanogenic bacteria. Trends Biochem. Sci. 10: 486-489, 1985.

7-17

А. Все наблюдения, связанные с ионофорами, согласуются с представлением о том, что перенос протонов по электрохимическому протонному градиенту служит источником энергии для движения жгутиков. Рассмотрим эти наблюдения подробнее.

1. При окислении глюкозы бактерии откачивают протоны из клетки, в результате чего на мембране устанавливается электрохимический протонный градиент, являющийся суммой протонного градиента и мембранного потенциала. При добавлении FCCP мембраны становятся проницаемыми для протонов, тем самым ликвидируется как протонный градиент, так и мембранный потенциал. В отсутствие электрохимического протонного градиента «мотор» жгутика не функционирует.

2. В среде с ионами K^+ антибиотик валиномицин специфически разрушает мембранный потенциал, вызывая вход ионов K^+ , который уравнивает выход протонов. В этих условиях только протонный градиент (который больше обычного, поскольку ему не противодействует мембранный потенциал) служит движущей силой потока протонов через жгутиковый «мотор». Способность бактерий нормально двигаться при наличии лишь протонного градиента служит убедительным доказательством того, что жгутиковый «мотор» приводится в действие протонами.

3. В отсутствие глюкозы (или любого другого субстрата окисления) электрохимический протонный градиент не возникает. Если снаружи есть K^+ , то валиномицин облегчает вхождение его внутрь клетки; это ведет к возникновению мембранного потенциала с положительным полюсом внутри клетки. Хотя в среде есть доступные протоны (из воды), этот мембранный потенциал ориентирован не так, чтобы приводить в движение поток протонов внутрь клетки. В результате бактерии в этих условиях остаются неподвижными.

4. В отсутствие глюкозы электрохимический протонный градиент не возникает. Если снаружи нет ионов K^+ (т.е. когда в среде присутствуют ионы Na^+), добавление валиномицина позволяет внутриклеточным ионам K^+ выходить из клетки (по направлению их концентрационного градиента), создавая мембранный потенциал с положительным полюсом снаружи клетки. Этот мембранный потенциал может заставлять протоны двигаться внутрь клетки. Каждый протон, вошедший в клетку, снижает величину мембранного потенциала, и так происходит до тех пор, пока потенциал полностью не исчезнет. В этот момент клетка перестает активно двигаться.

Б. С первого взгляда кажется странным, что нормальные бактериальные клетки могут двигаться при полном отсутствии кислорода. В таких условиях поток электронов в дыхательной цепи отсутствует, и, следовательно, нет связанной с этим потоком транслокации протонов через мембрану. В таком случае, каков источник протонов для приведения в действие жгутикового мотора в анаэробных условиях? Анализ мутантного штамма дает возможность ответить на этот вопрос. Лишенные АТР-синтетазы бактерии не могут активно двигаться. Это предполагает, что АТР-синтетаза каким-то образом генерирует протонный градиент. У нормальных бактерий в отсутствие кислорода образующийся анаэробно АТР используется для *обращения* действия АТР-синтетазы, т.е. для обеспечения выхода протонов из клетки. Возникающий электрохимический протонный градиент направляет протоны обратно через жгутиковый «мотор», обеспечивая дви-

жение бактерии. Мутантные бактерии не могут двигаться, если в среде нет глюкозы, поскольку у них нет АТФ-синтазы, а следовательно, они не могут образовывать электрохимический протонный градиент, когда нет транспорта электронов.

Литература: *Manson, M. D., Tedesco, P., Berg, H. C., Harold, F. M., van der Drift, C.* A protonmotive force drives bacteria flagella. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74,3060-3064, 1977.

Хлоропласты и фотосинтез

7-18

- А. строма
- Б. тилакоиды
- В. фотосинтетический транспорт электронов (световые); фиксация углерода (темновые)
- Г. рибулозобисфосфат-карбоксилаза
- Д. фиксация углерода (Кальвина Бенсона)
- Е. сахароза
- Ж. крахмал
- З. C_4 ; C_3
- И. хлорофилл
- К. антенный комплекс; фотохимический реакционный центр
- Л. нециклическое фотофосфорилирование
- М. Z-схема
- Н. циклическое фотофосфорилирование

7-19

- А. Правильно.
- Б. Неправильно. Непосредственно световая энергия необходима для образования O_2 , тогда как для фиксации CO_2 световая энергия требуется лишь опосредованно.
- В. Правильно.
- Г. Правильно.
- Д. Правильно.
- Е. Правильно
- Ж. Неправильно. При возбуждении электрона в хлорофилле переносится его энергия—но не сам электрон—от одной молекулы хлорофилла к другой с помощью резонансного механизма.
- З. Правильно.
- И. Правильно.
- К. Неправильно. Перенос каждого электрона от H_2O к $NADP^+$ требует затраты энергии двух фотонов, по одному для каждой фотосистемы. Следовательно, восстановление $NADP^+$ до $NADPH$, для которого нужно четыре электрона, требует четырех фотонов.
- Л. Неправильно. При циклическом фотофосфорилировании образуется только АТФ (а не $NADPH$), и равновесие между циклическим и нециклическим фотофосфорилированием зависит от потребности не в АТФ, а в $NADPH$.
- М. Правильно.
- Н. Правильно.

7-20 Кукуруза (C_4) в конце концов приведет герань (C_3) к гибели. Так как оба растения фиксируют CO_2 , его концентрация в замкнутой камере должна со временем падать. При низкой концентрации CO_2 кукуруза имеет очевидное преимущество, поскольку ее фермент, ответственный за начальный этап фиксации углерода, имеет

высокое сродство к CO_2 . Напротив, герань зависит от рибулозобисфосфат-карбоксилазы, имеющей меньшее сродство к CO_2 ; более того, при низких концентрациях CO_2 кислород конкурирует с CO_2 за присоединение к рибулозо-1,5-бисфосфату, что в конечном счете приводит к выделению CO_2 в процессе, известном как фотодыхание. Герань не только уступает CO_2 в неудачной попытке осуществить фотосинтез, но продолжает дышать за счет своих митохондрий, снабжая кукурузу еще большим количеством CO_2 . Кукуруза будет фиксировать CO_2 , пока герань не истощится и не погибнет.

Литература: Becker, W. M. The World of the Cell, p. 282. Menlo Park, Calif.: Benjamin-Cummings, 1986.

7-21

- А. Энергия одного моля фотонов при любой длине волны равна энергии одного фотона, умноженной на число Авогадро (N). Следовательно, энергия одного моля фотона при длине волны 400 нм равна

$$\mathcal{E} = Nhc/\lambda = \frac{6 \times 10^{23} \text{ фотонов}}{\text{моль}} \times \frac{1,58 \times 10^{-37} \text{ ккал} \cdot \text{с}}{\text{фотон}} \times \frac{3 \times 10^{17} \text{ нм}}{\text{с}} \times \frac{1}{400 \text{ нм}}$$

$\mathcal{E} = 71 \text{ ккал/моль}$ для света с длиной волны 400 нм.

Подобные расчеты для длин волн 680 и 800 нм дают:

$\mathcal{E} = 42 \text{ ккал/моль}$ для длины волны 680 нм,

$\mathcal{E} = 36 \text{ ккал/моль}$ для длины волны 800 нм.

- Б. Если на площадку в 1 м^2 падает свет с длиной волны 680 нм и мощностью 0,3 ккал/с, который характеризуется энергией фотонов 42 ккал/моль, то время, за которое эта площадка получит один моль фотонов, будет равно:

$$\text{время/моль} = \frac{\text{с}}{0,3 \text{ ккал}} \times \frac{42 \text{ ккал}}{\text{моль}},$$

время/моль = 140 с/моль.

- В. Если для того чтобы на один квадратный метр поверхности листьев томата попал один моль фотонов, требуется 140 с, а для фиксации одной молекулы CO_2 нужно 8 фотонов, то для синтеза одного моля глюкозы потребуется около двух часов:

$$\text{время} = \frac{140 \text{ с}}{\text{моль фотонов}} \times \frac{8 \text{ моль фотонов}}{\text{моль } \text{CO}_2} \times \frac{6 \text{ моль } \text{CO}_2}{\text{моль глюкозы}},$$

время = 6720 с, или 112 мин.

Действительная эффективность захвата фотонов гораздо ниже, чем 100%. При оптимальных условиях для некоторых быстро растущих растений эффективность использования фотонов, попадающих на лист, составляет около 5%. Однако даже эта оценка сильно преувеличивает истинную эффективность использования энергии солнечного света. Например, на поле сахарной свеклы растениями используется только около 0,02% энергии света, попадающего на него за весь вегетационный период. Эффектив-

ность использования света лимитируется рядом факторов, в том числе насыщением фотосистем при уровне освещенности гораздо более низком, чем интенсивность солнечного света, обеспеченностью водой, низкими температурами.

- Г. В противоположность очень низкой общей эффективности использования света, эффективность превращения энергии света в химическую энергию *после захвата фотона* составляет 33%:

$$\text{эффективность} = \frac{\text{моль CO}_2}{8 \text{ моль фотонов}} \times \frac{\text{моль фотонов}}{42 \text{ ккал}} \times \frac{112 \text{ ккал}}{\text{моль CO}_2} = 0,33, \text{ или } 33\%.$$

7-22

- А. Для образования крахмала кактусам и C_4 -растениям (так же как и C_3 -растениям) необходим свет. Для синтеза крахмала нужны АТФ и NADPH. Эти соединения присутствуют в клетках лишь в малых количествах: они не запасаются. В ходе синтеза крахмала АТФ и NADPH должны постоянно возобновляться, чтобы синтез мог продолжаться. Для регенерации АТФ и NADPH необходимо протекание реакций фотосинтетического электронного транспорта. Энергия солнечного света энергизует электроны в хлорофилле. Некоторые из них передаются на NADP^+ , в результате чего образуется NADPH; другие переносятся по электронтранспортной цепи, при этом возникает электрохимический протонный градиент, который сопряжен с образованием АТФ.

- Б. Фиксация CO_2 в кактусах схематически изображена на рис. 7-27. Реакции, показанные толстыми линиями, происходят ночью; реакции, показанные тонкими линиями, — днем. Реакции фиксации углерода в кактусах по-существу такие же, как в C_4 -растениях. Ключевое различие метаболических путей фиксации CO_2 состоит в том, что кактус использует крахмал для накачивания CO_2 . Однако общие для C_4 -растений и кактусов реакции накачивания CO_2 распределяются по-разному в пространстве и во времени у растений этих типов. У C_4 -растений эти реакции происходят в клетках разных типов, но все одновременно. У кактусов же, напротив, все эти реакции идут в одной и той же клетке, но в разное время.

- В. Для накачивания CO_2 C_4 -растениям крахмал не нужен, потому что вещества, которые составляют CO_2 -насос, используются как катализаторы. В принципе небольшое количество молекул фосфоенолпирувата (ФЕП) могло бы обеспечивать накачивание неограниченного количества CO_2 , поскольку ФЕП регенерирует в конце каждого цикла переноса. В противоположность этому реакции, протекающие в кактусах, являются стехиометрическими: для фиксации каждой молекулы CO_2 , которая входит в результате в состав малата, требуется одна молекула ФЕП. Крахмал у кактусов используется как источник этих молекул ФЕП при участии реакций гликолиза, а потому количество молекул CO_2 , которые могут быть зафиксированы (связаны), ограничивается количеством крахмала.

- Г. Основное преимущество такого метода фиксации CO_2 состоит в том, что при перегревании (днем) кактус может изолировать сам себя (закрывать свои устья), предохраняясь от потери воды, но при этом он может постоянно обеспечивать поступление CO_2 (из запасенного малата) для синтеза сахара в дневное время, когда образование АТФ и NADPH за счет реакций фотосинтетического транспорта электронов достигает максимального уровня. Ночью

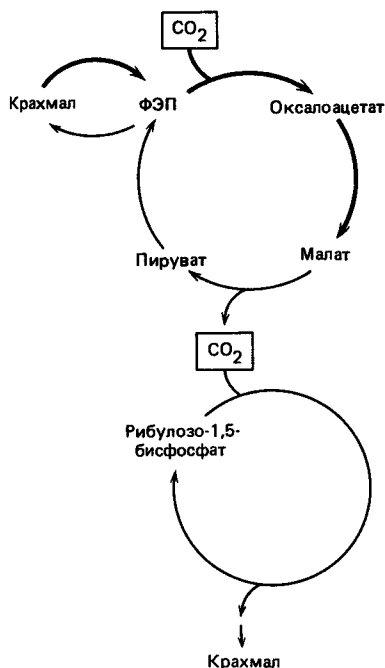


Рис. 7-27. Фиксация CO_2 у кактуса (ответ 7-22). Темновые реакции показаны жирными линиями, световые реакции — тонкими линиями. Указан только путь углерода; необходимые кофакторы не показаны.

же, когда риск потери воды уменьшается, кактус может опять открыть свои устья и продолжить фиксацию атмосферного CO_2 .

Литература: Foyer, C. H. Photosynthesis, pp. 176–195. New York: Wiley, 1984.

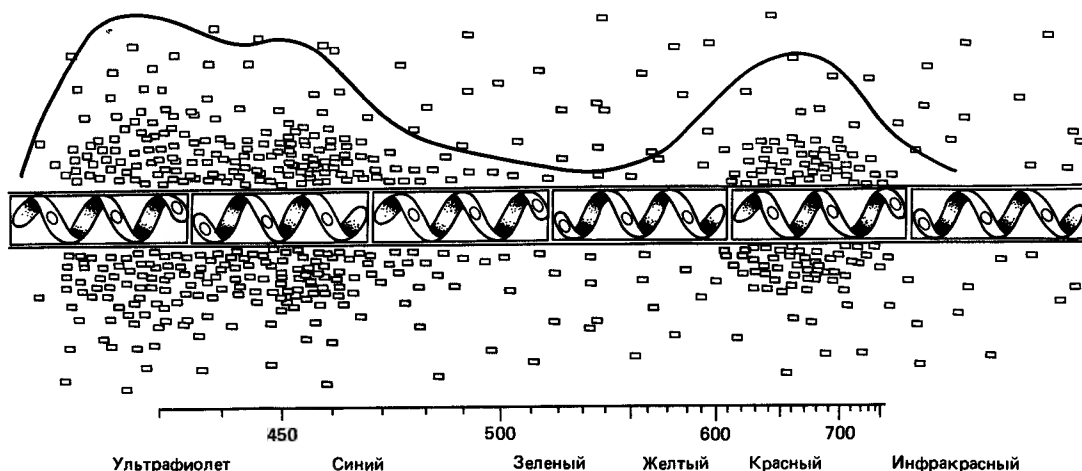
- 7-23** Одним из способов измерения фотосинтеза служит оценка выделения O_2 . В 1882 г. еще не было ни одного из тех чувствительных устройств для измерения содержания O_2 , которые появились позднее. Вместо них Энгельман применил для этой цели бактерии, которые лучше растут в присутствии O_2 и активно «ищут» его. Когда водоросли освещали светом, разложенным в спектр, то лишь в тех участках, куда попадал свет синей и красной областей спектра, происходил фотосинтез и выделялся кислород. Бактерии, которые используют O_2 , концентрировались в основном вокруг участков водоросли, выделявших кислород. Таким образом, плотность бактерий позволяет грубо оценить скорость выделения O_2 , а спектр действия (скорость выделения O_2 при разных длинах волн) может быть приблизительно представлен плотностью бактерий в зависимости от области спектра (рис. 7-28).

Литература: Curtis, H. Biology, 4th ed., p. 216. New York: Worth, 1983.

- 7-24** «Вспышка» выделения кислорода при переключении освещения на длину волны 650 нм свидетельствует о том, что свет именно этой длины волны стимулирует фотосистему II, которая принимает электроны непосредственно от воды, что сопровождается выделением свободного кислорода. Сходным образом падение выделения кислорода при переключении освещения на длину волны 700 нм свидетельствует о стимуляции этим светом фотосистемы I, которая принимает электроны из электронтранспортной цепи и, таким образом, дальше отстоит от реакций, в ходе которых освобождается кислород. Такое объяснение подтверждается более детальным анализом спектральных переходов, приведенным ниже.

Спектральные переходы происходят в результате того, что две фотосистемы не находятся в равновесии друг с другом. Каждая из указанных выше длин волн преимущественно (но не абсолютно) стимулирует одну из двух фотосистем. Так, когда стимулируется фотосистема I (светом с длиной волны 700 нм), она выкачивает электроны из электронтранспортной цепи (связывающей обе фотосистемы), переводя переносчики этой цепи в относительно

Рис. 7-28. Спектр действия для нитчатой зеленой водоросли (ответ 7-23).



окисленное состояние, подготовленное к приему электронов из фотосистемы II. Когда происходит переключение на свет с длиной волны 650 нм (который стимулирует фотосистему II), электроны вначале быстро передаются от H_2O по цепи цитохромов, что вызывает «вспышку» выделения O_2 . Однако поток электронов через цитохромы быстро уменьшается из-за того, что электроны могут переноситься в фотосистему I, которая стимулируется, но на субоптимальном уровне, и в результате выделение O_2 замедляется.

Если вновь переключить освещение на длину волны 700 нм, давление потока электронов из фотосистемы II (которая теперь будет стимулироваться почти оптимально) будет недостаточным, чтобы электроны передавались на относительно восстановленные (богатые электронами) цитохромы. В результате выделение O_2 будет временно подавлено, пока не произойдет оттока электронов от цитохромов. Как только начнется частичный отток электронов, цитохромы опять смогут принимать электроны из фотосистемы II, и тем самым восстановится нормальный уровень образования кислорода.

Литература: Emerson, R. Ann. Rev. Plant Physiol. 9:1 24, 1958.

Lawlor, D. M. Photosynthesis: Metabolism, Control, and Physiology. New York, Wiley, 1987.

7-25

- А. Поскольку стимуляция светом с длиной волны 680 нм способствует удалению электронов из цитохромов, т. е. окислению последних, этот свет должен преимущественно стимулировать фотосистему I, которая переносит электроны от цитохромов к $NADP^+$ (рис. 7-29). Последующая стимуляция светом с длиной волны 562 нм заставляет электроны двигаться к цитохромам с большей скоростью, чем раньше, делая их более восстановленными. Следовательно, свет с длиной волны 562 нм должен стимулировать фотосистему II, которая переносит электроны от воды к цитохромам (рис. 7-29). Таким образом, в этих водорослях, как и у большинства растений, более длинноволновый свет стимулирует главным образом фотосистему I, а более коротковолновый — преимущественно фотосистему II.
- Б. Эти результаты служат основой для нескольких линий доказательств Z-схемы фотосинтеза. Во-первых, различные эффекты при двух длинах волн предполагают наличие по крайней мере двух компонентов, различающихся по своей реакционной способности при разных длинах волн. Во-вторых, две длины волны света оказывают противоположное действие на редокс-состояние цитохромов — свет с длиной волны 680 нм вызывает их окисление, а свет с длиной волны 562 нм — восстановление. Наконец, эффекты при двух длинах волн можно разделить, добавив DCMU, что указывает на существование связи между двумя фотосистемами через цитохромы (рис. 7-29).

- В. Эти результаты указывают на то, что добавление DCMU блокирует электронный транспорт через цитохромы на участке вблизи фотосистемы II (рис. 7-29). Таким образом, когда фотосистема I стимулируется светом с длиной волны 680 нм в присутствии DCMU, по ней переносятся те электроны, которые могут поступить от цитохромов, что приводит к окислению последних. Кроме того, в присутствии DCMU не происходит переноса электронов на цитохромы за счет стимуляции фотосистемы II светом с длиной волны 562 нм (рис. 7-15, В). Оба эффекта указывают на то, что

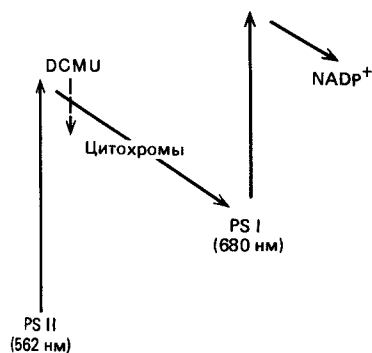


Рис. 7-29. Упрощенная Z-схема фотосинтеза, показывающая связь между двумя фотосистемами, расположение цитохромов и место действия DCMU (ответ 7-25).

DCMU блокирует электронный транспорт вблизи начала цитохромной цепи.

Литература: *Duysens, L. N. M., Ames, J., Kamp, B. M.* Two photochemical systems in photosynthesis. *Nature* 190, 510–511, 1961.

7-26

А. Эти результаты подтверждают существование связи по способу «зубчатого колеса» между отнятием электронов от воды и их активацией в реакционном центре фотосистемы II. Периодичность выделения O_2 в ответ на вспышки света исключает возможность того, что четыре фотона одновременно достигают реакционного центра. Если бы четыре фотона были нужны одновременно, то все вспышки света давали бы одинаковое выделение O_2 .

Периодичность свидетельствует также против представления о кооперативности в работе четырех реакционных центров при освобождении из воды одной молекулы O_2 . При насыщающем световом облучении любая вспышка должна стимулировать большинство реакционных центров; если бы они могли кооперироваться, то выделение O_2 происходило бы при каждой вспышке. Кроме того, результаты экспериментов с DCMU полностью исключают возможность кооперации. Если бы для кооперативного взаимодействия нужно было четыре реакционных центра, то можно было бы ожидать, что зависимость выделения O_2 от концентрации реакционных центров будет четвертого порядка. Однако тридцатикратное уменьшение числа активных центров (DCMU подавляет 97% активных центров) приводило лишь к тридцатикратному уменьшению выделения O_2 (максимумы образования кислорода составляли 3% от тех, которые наблюдались в отсутствие DCMU) вместо неизмеримо более сильного снижения (30^4) в случае зависимости четвертого порядка.

Периодичность в выделении O_2 была именно такой, какую следовало ожидать, если предполагать связь по типу «зубчатого колеса» между извлечением множества электронов из воды и световым возбуждением единичных электронов в реакционных центрах фотосистемы II. Более того, каждое «зубчатое колесо» должно обслуживать единичный реакционный центр. Если бы одно «колесо» могло взаимодействовать, например, с четырьмя реакционными центрами, то оно при каждой вспышке передавало бы свои четыре электрона, полученные из воды, что привело бы к выделению O_2 при каждой вспышке без какой-либо периодичности.

Б. Выделение O_2 с периодичностью один подъем на четыре вспышки света указывает на то, что «зубчатое колесо» захватывает четыре электрона сразу от двух молекул воды, а передает их на реакционный центр фотосистемы II по одному. По тому, в какой момент появляется первый подъем выделения O_2 , можно судить о состоянии этого «колеса» при адаптации к темноте: можно утверждать, что оно держит в этом случае три электрона. Три первые вспышки света позволяют перенести эти электроны. Затем «зубчатое колесо» может захватить четыре новых электрона от двух молекул воды (в ходе реакции, зависящей от света), в результате чего выделяется молекула кислорода. (В действительности около четверти «зубчатых колес» несут в темновом периоде по четыре электрона, чем объясняется значительное выделение кислорода во время четвертой вспышки света.)

В. Периодичность постепенно затухает с увеличением числа вспышек света, потому что синхронность ответа многочисленных фото-

систем нарушается. Во время одной вспышки света большинство реакционных центров фотосистемы улавливает по одному фотону: однако некоторые реакционные центры — по два, а иные вообще не захватывают ни одного фотона. Те реакционные центры, которые не захватывают ни одного фотона или захватывают сразу два, сбиваются с общего ритма. После нескольких вспышек света число таких центров возрастает настолько, что уже нельзя выявить какой-либо периодичности. Период темновой адаптации в начале эксперимента нужен для того, чтобы привести большую часть реакционных центров в одинаковое состояние. Только тогда можно наблюдать периодичность.

Литература: *Forbush, B., Kok, B., McGloin, M.* Cooperation of charges in photosynthetic oxygen evolution II. Damping of flash yield, oscillation and deactivation. *Photochem. Photobiol.* 14, 307–321, 1971.

7-27

А. Чтобы эффективно поддерживать синтез АТФ, протоны должны попадать внутрь тилакоидной везикулы, создавая (на щелочной стадии эксперимента) электрохимический протонный градиент, приводящий в действие синтез АТФ. (Помните, что протоны переносятся в полость тилакоидов, когда поток электронов проходит по электронтранспортной цепи хлоропластов.) Мембраны тилакоидов, подобно внутренним мембранам митохондрий, сравнительно мало проницаемы для протонов. В результате HCl, полностью диссоциирующая на ионы, не способна эффективно снизить pH внутри везикул. С другой стороны, янтарная кислота диссоциирована в растворе менее, чем на половину при pH 4 (который ниже обеих величин ее pK), и в своей неионизованной форме она может свободно пересекать мембрану. Пройдя через мембрану, она может диссоциировать и стать источником протонов внутри везикулы. Таким образом, подкисление с помощью янтарной кислоты дает больше молекул АТФ, потому что эта кислота более эффективна в доставке протонов внутрь везикул.

Выход АТФ возрастает с увеличением концентрации янтарной кислоты, потому что по мере этого увеличения больше молекул недиссоциированной кислоты попадает в везикулу. Более высокая концентрация янтарной кислоты внутри везикулы дает возможность пройти через АТФ-синтазу большему количеству протонов, а следовательно, способствует возрастанию выхода АТФ.

Б. Выход АТФ зависит от pH на щелочной стадии опыта, потому что этот pH определяет величину pH-градиента, а чем больше величина электрохимического протонного градиента, тем больше АТФ может синтезироваться.

В. Из всех предлагаемых обработок только добавление FCCP влияет на синтез АТФ. FCCP переносит протоны через мембрану, разрушая тем самым протонный градиент и делая невозможным синтез АТФ.

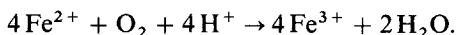
Другие воздействия, изменяя поток электронов через цитохромы (DCMU и темнота останавливают поток электронов, яркий свет усиливает этот поток), не влияют на синтез АТФ. Остановка потока электронов не влияет на величину электрохимического протонного градиента, потому что последняя задается обработкой кислотой или щелочью. Яркий свет, который должен усилить поток электронов и увеличить электрохимический градиент, в опыте не оказывает действия. Однако если вы предсказали, что данное воздействие должно привести к увеличению синтеза АТФ, — это можно понять, первые исследователи тоже думали, что

так должно быть. Очевидно, величина искусственного электрохимического градиента настолько велика, что на нее не влияет сколь-нибудь значительно нормальный поток электронов через цитохромы.

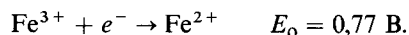
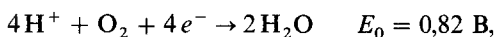
Литература: Jagendorf, A. T., Uribe, E. ATR formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55:170-177, 1966.

7-28

- А. Уравнение равновесия для реакции восстановления O_2 железом Fe^{2+} записывается следующим образом:



Разделим эту протекающую в клетке реакцию на две части:



В этой равновесной реакции Fe^{2+} отдает электроны, следовательно,

$$\Delta E_0 = 0,82 \text{ В} - 0,77 \text{ В},$$

$$\Delta E_0 = 0,05 \text{ В}.$$

Если реакция протекает в стандартных условиях, то $\Delta E = \Delta E_0$. Используя соотношение между ΔE и ΔG , получим

$$\Delta G = -nF\Delta E = -4 \times 23 \text{ ккал/(В} \cdot \text{моль)} \times 0,05 \text{ В},$$

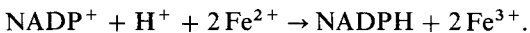
$$\Delta G = -4,6 \text{ ккал/моль}$$

либо, как иногда представляют,

$$\Delta G = -1,15 \text{ ккал/моль на каждый электрон}.$$

Таким образом, поток электронов от Fe^{2+} к O_2 термодинамически выгоден; однако изменение свободной энергии в расчете на каждый электрон чрезвычайно низко. Интересно, что для *T. ferrooxidans* эта окислительно-восстановительная реакция важна не как источник энергии, а скорее как путь обезвреживания поступающих в клетку протонов и как источник электронов для восстановления $NADP^+$.

- Б. Уравнение реакции восстановления $NADP^+ + H^+$ с участием железа Fe^{2+} записывается так:



Две части этой реакции, протекающей в клетке, таковы:



В равновесной реакции Fe^{2+} отдает электроны, следовательно,

$$\Delta E_0 = -0,32 \text{ В} - 0,77 \text{ В},$$

$$\Delta E_0 = -1,09 \text{ В}.$$

В нестандартных условиях:

$$\Delta E = \Delta E_0 - \frac{2,3 RT}{nF} \log_{10} \frac{[NADPH] [Fe^{3+}]^2}{[NADP^+] [Fe^{2+}]^2}.$$

Так как концентрации Fe^{2+} и Fe^{3+} одинаковы, их можно сократить. Тогда

$$\Delta E = -1,09 \text{ В} - \frac{2,3}{2} \times \frac{1,98 \cdot 10^{-3} \text{ ккал}}{\text{К} \cdot \text{моль}} \times 310 \text{ К} \frac{\text{В} \cdot \text{моль}}{23 \text{ ккал}} \log_{10} \frac{10}{1} =$$

$$= -1,09 \text{ В} - 0,03 \text{ В},$$

$$\Delta E = -1,12 \text{ В}.$$

Если условия стандартные, то $\Delta E = \Delta E_0$ и

$$\Delta G = -nF \Delta E = -2 \times 23 \text{ ккал}/(\text{В} \cdot \text{моль}) \times (-1,09 \text{ В}),$$

$$\Delta G = 50,1 \text{ ккал/моль (или 25 ккал/моль на каждый электрон)}.$$

В нестандартных условиях:

$$\Delta G = -2 \times 23 \text{ ккал}/(\text{В} \cdot \text{моль}) \times (-1,12 \text{ В}),$$

$$\Delta G = 51,5 \text{ ккал/моль (или 26 ккал/моль на каждый электрон)}.$$

Эти расчеты ясно показывают, что восстановление NADP^+ с участием Fe^{2+} крайне затруднено.

- В. В отсутствие мембранного потенциала изменение свободной энергии за счет потока протонов внутрь клетки можно выразить так:

$$\Delta G = 2,3 RT \log_{10} \frac{[\text{H}^+]_{\text{внутр}}}{[\text{H}^+]_{\text{внешн}}} =$$

$$= 2,3 \times \frac{1,98 \times 10^{-3} \text{ ккал}}{\text{К} \times \text{моль}} \times 310 \text{ К} \log_{10} \frac{10^{-6,5}}{10^{-2,0}}$$

$$= 2,3 \times \frac{1,98 \times 10^{-3} \text{ ккал}}{\text{К} \times \text{моль}} \times 310 \text{ К} \log_{10} 10^{-4,5},$$

$$\Delta G = -6,4 \text{ ккал/моль}.$$

Если ΔG для синтеза АТФ составляет 11 ккал/моль, то нужно по крайней мере два моля протонов ($2 \times -6,4 \text{ ккал/моль} = -12,8 \text{ ккал/моль}$), чтобы этот синтез мог осуществляться. Таким образом, для синтеза каждой молекулы АТФ в клетку должно переноситься два протона.

Энергия переноса должна тратиться на синтез АТФ, но термодинамические расчеты не позволяют выяснить действительный механизм такого сопряжения. Протоны могли бы входить в клетку по одному или вместе в зависимости от механизма. Если они входят по одному, то энергия от первого протона должна быть сохранена, чтобы к ней добавилась энергия от следующего протона. Если АТФ-синтетаза у *T. ferrooxidans* работает как и в других клетках (т. е. без образования промежуточных макроэргических продуктов), то оба протона должны войти в клетку одновременно.

- Г. Если в стандартных условиях для восстановления NADP^+ требуется энергия 50,1 ккал/моль, то в клетку должно войти не менее 8 молей протонов ($8 \times -6,4 \text{ ккал/моль} = -51,2 \text{ ккал/моль}$), чтобы электроны от Fe^{2+} были перенесены на NADP^+ .

И вновь термодинамические расчеты не позволяют решить, каков же действительный механизм, по которому электроны от Fe^{2+} используются на восстановление NADP^+ . Транспорт протонов мог бы сопрягаться с обратным потоком электронов многими способами. В принципе перенос восьмью протонами мог бы непосредственно быть связан с переносом пары электронов от 2 Fe^{2+} к NADP^+ . Другой путь — электроны могли бы независимо активироваться с помощью какого-то механизма, в котором для активации одного электрона требуется четыре протона. Однако

более вероятным представляется такой механизм, когда электроны активируются ступенчато, при продвижении от переносчика к переносчику по цепи электронного транспорта подобно тому как происходит обращение нормального электронного транспорта в митохондриях.

- Д. Для фиксации каждого моля CO_2 в глицеральдегид-3-фосфате нужно три моля АТФ и два моля NADPH. Для предварительного синтеза этих молекул необходима трата 22 молей протонов ($3 \times 2\text{H}^+$ для АТФ и $2 \times 8\text{H}^+$ для NADPH). Следовательно, 22 моля Fe^{2+} должны окислиться, чтобы нейтрализовать поступившие в клетку протоны. К тому же нужно два моля Fe^{2+} в качестве донора электронов для восстановления каждого моля NADPH. Таким образом, чтобы 1 моль CO_2 был фиксирован в глицеральдегид 3-фосфате, должно окислиться 26 молей Fe^{2+} .

T. ferrooxidans, следовательно, производит огромные количества Fe^{3+} во время своей жизнедеятельности. Если бы в рудных отвалах не было других подходящих восстановителей, то все железо могло быть окислено бактериями и рост бактерий полностью бы прекратился.

Литература: Ingledew, J. W. *Thiobacillus ferrooxidans*: the bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. Biochim. Biophys. Acta 683:89–117, 1982.

Эволюция электронтранспортных цепей

7-29

- А. брожение

7-30

- А. Правильно.
Б. Правильно.
В. Правильно.
Г. Правильно.
Д. Правильно.
Е. Правильно.

Геномы митохондрий и хлоропластов

7-31

- А. менделевское наследование (цитоплазматическая наследственность)
Б. митотическая сегрегация
В. материнская
Г. цитоплазматические мутанты «petite»
Д. цикл мочевины
Е. гипотеза эндосимбиоза

7-32

- А. Неправильно. Органеллы, в которых происходит превращение энергии, делятся на протяжении всей интерфазы, причем каждая из них делится независимо от остальных и от всей клетки. Точно так же репликация ДНК органеллы происходит не только в S-фазе, но и продолжается в течение всего клеточного цикла. Однако процесс регулируется таким образом, что общее число молекул ДНК в органеллах удваивается за каждый клеточный цикл.
Б. Правильно.

- В. Неправильно. Синтез белка и в хлоропластах, и в митохондриях гораздо более сходен с синтезом белка у бактерий, чем с таковым в цитоплазме. Верно то, что механизм синтеза белка в хлоропластах сходен с бактериальным механизмом в большей степени, чем с механизмом синтеза в митохондриях, но оба они весьма напоминают бактериальный.
- Г. Правильно.
- Д. Неправильно. Митохондриальный генетический код несколько отличается от ядерного, а также в небольшой степени варьирует от вида к виду.
- Е. Правильно.
- Ж. Правильно.
- З. Неправильно. Присутствие интронов в генах органелл представляет собой удивительный факт, потому что в соответствующих бактериальных геномах таких интронов не обнаружено.
- И. Правильно.
- К. Неправильно. Пестрые листья образуются в результате митотической сегрегации нормальных и дефектных хлоропластов.
- Л. Правильно.
- М. Правильно.
- Н. Неправильно. Митохондрии из разных тканей одного организма часто обнаруживают характерные тканеспецифические различия в содержании белков, закодированных в ядерном геноме.
- О. Правильно.
- П. Правильно.
- Р. Правильно.

7-33

- А. Представленные на рис. 7-20 данные точно соответствуют тому, чего следовало ожидать при случайной по времени репликации митохондриальной ДНК в течение клеточного цикла. Независимо от длительности промежутка между добавлением двух меток в репликацию включается постоянная доля меченой ^3H -тимидином ДНК. Даже то, что фракция ДНК большей плотности составляет неизменно около 10% общего количества ДНК, соответствует ожиданию, потому что период мечений БУДР (2 ч) тоже составляет около 10% длительности клеточного цикла (20 ч).
Если бы репликация митохондриальной ДНК происходила в определенной фазе клеточного цикла, то ДНК, которая метится ^3H -тимидином, не реплицировалась бы вторично до наступления той же фазы цикла. В результате очень мало радиоактивной ДНК включило бы БУДР и изменилось по плотности до этого момента. Критическая же фаза клеточного цикла была бы обнаружена в данном эксперименте по высокой доле меченой ДНК (с большей плотностью) при определенной длительности промежутка между введением меток.
- Б. Действительно, клеточная популяция в опыте является асинхронной, но эта асинхронность не имеет значения для интерпретации результатов. Если митохондриальная ДНК реплицируется по времени случайным образом, то синхронность клеточной популяции не существенна. Замечание вашего коллеги относится к тому, что асинхронность клеточной популяции могла помешать установлению временного хода репликации митохондриальной ДНК. Ваше остроумное экспериментальное решение, однако, позволило обойти это потенциальное препятствие. Если бы митохондрии реплицировались в какой-то особый период клеточного цикла, то при добавлении на короткое время ^3H -тимидина



Рис. 7-30. Пик изменения плотности ядерной ДНК (ответ 7-33).

метка включилась бы лишь в те клетки, которые находились на этом этапе цикла. Поскольку в остальной части эксперимента вы следите только за радиоактивными молекулами ДНК митохондрий, то кратковременное добавление метки по существу позволило иметь дело как бы с синхронной клеточной популяцией — вы не видите того, что происходит в других клетках, которые в период мечения не реплицировались.

В. Анализ ядерной ДНК должен показать пик изменения плотности в период между 15 и 20 ч и очень небольшие сдвиги в плотности радиоактивной ДНК при более коротких промежутках между введением двух меток (рис. 7-30). Поскольку ядерная ДНК реплицируется в особой S-фазе клеточного цикла, то при добавлении ^3H -тимидина будут метиться только те клетки, которые находятся в этой фазе цикла. Ядерная ДНК в меченых клетках не будет реплицироваться вновь, пока клетки не пройдут весь клеточный цикл и не вернуться в S-фазу. Если клетки были помечены ^3H -тимидином на стадии окончания S-фазы, то они опять достигнут S-фазы через 15 ч (или около этого) — именно в это время их плотность может измениться при инкубации с БУДР. Если клетки во время мечения находились в начале S-фазы, они войдут снова в S-фазу не раньше, чем через 20 ч. Изменение плотности меченой ядерной ДНК действительно обнаруживается в интервале между 15 и 20 ч. ДНК с измененной плотностью проявляется в виде пика, а не плато, потому что за время более длительное, чем 20 ч, меченая ДНК выходит из S-фазы и снова становится неподверженной изменению плотности.

Г. Если бы молекулы ДНК митохондрий реплицировались в произвольные моменты времени в пределах клеточного цикла, но перерыв между периодами репликации отдельных молекул был равен времени одного клеточного цикла, то пик изменения плотности наблюдался бы между 18 и 20 ч. Те молекулы, которые реплицировались во время инкубации с ^3H -тимидином, должны были пометиться. Если бы эти молекулы должны были ждать один клеточный цикл до очередной репликации, то изменение плотности не коснулось бы их, пока не прошел бы полный клеточный цикл. Таким образом, молекулы митохондриальной ДНК, помеченные в начале опыта, не будут изменяться по плотности, пока не пройдет 18–20 ч после отмывания невключенной метки. (Экспериментальные данные будут сходны с данными по репликации ядерной ДНК, так как последняя также реплицируется один раз за полный цикл; однако по времени поведение этих ДНК несколько различалось бы, поскольку митохондриальная ДНК реплицируется за 2 ч, а ядерная — за 5 ч.)

Литература: Bogenhagen, D., and Clayton, D. A. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. Cell 11:719–727, 1977.

7-34

А. Инициация синтеза белка в митохондриях отличается от инициации синтеза белка в цитоплазме по двум признакам. Первое отличие очевидно: кодон AUA в митохондриях служит кодоном инициации и кодирует метионин (рис. 7-22, мРНК 13). При цитоплазматическом синтезе белка кодон AUA кодирует изолейцин и не связан с инициацией синтеза белка. Второе отличие более тонкое: в митохондриях кодирующая белок область начинается сразу от 5'-конца мРНК (рис. 7-22, мРНК 7 и мРНК 16). Цитоплазматические (и бактериальные) мРНК обычно имеют

короткий участок из нетранслируемых нуклеотидов на своем 5'-конце, который, как считают, способствует продвижению рибосом вдоль цепи мРНК. У бактерий имеется короткая последовательность перед стартовым кодоном, с которой гибридизуется рибосомальная РНК. В цитоплазме рибосомы связываются с 5'-кэпом (модифицированный G, прикрепляемый посттранскрипционно к концу мРНК) и насаживаются на мРНК в месте, удаленном на некоторое расстояние от первого стартового кодона. Ни одна из этих особенностей не обнаружена на 5'-концах митохондриальной мРНК.

- Б. Кодоны терминации синтеза белка в митохондриях являются необычными в двух отношениях. Во-первых, кодон терминации в мРНК 16—это AGA (рис. 7-22), который в ядре кодирует аргинин. Во-вторых, кодоны терминации в мРНК 7 и 13 не полностью закодированы в ДНК; вместо этого они образуются путем добавления «хвоста» в виде poly(A) (рис. 7-22). В мРНК 7 закодирован только начальный нуклеотид U из стоп-кодона UAA; в мРНК 13 закодирован начальный динуклеотид UA стоп-кодона.
- В. Присутствие генов тРНК точно на границах генов мРНК указывает на то, что они могли бы участвовать в процессинге мРНК из одного длинного первичного транскрипта. Считается, что различные тРНК служат структурными указателями при процессинге первичного транскрипта. Образующие тРНК структуры типа клеверного листа служат опознавательными знаками на концах мРНК. Предполагается, что структуры тРНК узнаются, а затем отщепляются у их концов для отделения от первичного транскрипта. То, что остается после процессинга тРНК, является молекулой собственно мРНК. Эта схема известна как модель процессинга РНК с отщеплением тРНК.

Литература: Montoya, J., Ojala, D., Attardi, G. Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature* 290,465–470, 1981.

Ojala, D., Montoya, J., Attardi, G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290,470–474, 1981.

7-35

- А. ДНК хлоропластов, находится ли она в чистом виде или в качестве примеси в препарате ДНК митохондрий, будет разрезаться на одни и те же фрагменты. Следовательно, любая полоса, которая появляется в одном и том же положении на дорожках, относящихся к хлоропластам и митохондриям, вероятно, обусловлена примесью. Таким образом, средняя полоса в препарате цуккини и обе полосы в препарате гороха говорят о наличии загрязнения. Лишь те фрагменты, которые выявляются исключительно в дорожках для митохондриальной ДНК (и только на них), являются кандидатами на роль ДНК, перенесенной из хлоропластов в митохондрии.

(На практике количество хлоропластной ДНК, которую при разделении наносят рядом с митохондриальной, устанавливается эмпирически, так что загрязняющие полосы дают одинаковую интенсивность гибридизации. Если одинаковые количества хлоропластной и митохондриальной ДНК двигались бок-о-бок, то гибридизация с «чистой» хлоропластной ДНК должна была поглотить сигнал от небольшого количества хлоропластной ДНК, загрязняющей препарат митохондриальной ДНК.)

- Б. Только в случае цуккини и кукурузы видны полосы, которые, вероятно, возникли от переноса ДНК из хлоропластов в мито-

хондрии, так как только у них есть полосы, выявляемые исключительно на дорожках для митохондриальной ДНК.

Литература: Stern, D. B., Palmer, J. D. Extensive and widespread homologies between mitochondrial DNA and chloroplast DNA in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1946–1950, 1984.

7-36 Отклонения в характере поглощения цитохромов указывают на то, что обе мутации, *roky* и *pinu*, влияют на функционирование митохондрий. Генетический анализ свидетельствует о цитоплазматическом наследовании для *roky* и о ядерном для *pinu*.

Скрещивания 7, 8 и 9 (табл. 7-4) являются контрольными. Они показывают, что потомство гриба дикого типа всегда характеризуется высокими скоростями роста, а потомство мутантов – низкими скоростями роста.

Скрещивания 1 и 2 показывают цитоплазматический характер наследования мутации *roky*. Когда она присутствовала у протоперитециального родителя (донора цитоплазмы), все споры росли медленно (скрещивание 1); если она имела у оплодотворяющего родителя, споры росли быстро (скрещивание 2). Этот результат и следовало ожидать, если донор цитоплазмы определяет тип присутствующих в спорах митохондрий. В скрещивании 1 цитоплазматическим донором был *roky*, и споры росли медленно. При скрещивании 2 цитоплазматическим донором был дикий тип, и споры росли быстро.

Скрещивания 3 и 4 показывают, что наследование мутации *pinu* – ядерное. В обоих скрещиваниях *pinu* вносит при слиянии мутантный ген, а дикий тип – нормальный ген. Эти гены разделяются по спорам поровну (менделевское наследование), так что половина потомства растет быстро, а другая половина – медленно.

Результаты скрещиваний 5 и 6 несколько более сложны для интерпретации, потому что они включают взаимодействие двух мутаций. В скрещивании 5 *roky* – цитоплазматический донор, и поскольку все споры получают митохондрии *roky*, они растут медленно. Некоторые споры (почти половина) будут нести также мутацию *pinu* в ядре (другая половина будет иметь ядро дикого типа – от *roky*), но качество ядра (нормальное или мутантное) не имеет значения, потому что митохондрии уже «испорчены» мутацией *roky*. В скрещивании 6 *roky* – ядерный донор (*pinu* – донор цитоплазмы); следовательно, мутация *roky* отсутствует во всех спорах. И снова половина спор будет нести в себе мутацию *pinu*, а половина спор будет дикого типа; однако в отсутствие митохондрий *roky* проявится ядерный фенотип. Таким образом, половина спор будет расти быстро, а другая половина – медленно.

Изучение подобных отклонений от ожидаемого менделевского поведения генов позволило в конечном итоге установить, что митохондрии (позднее оказалось, что и хлоропласты) несут в себе генетический материал.

Литература: Mitchell, M. B., Mitchell, H. K. A case of “maternal” inheritance in *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38,442–449, 1952.

Mitchell, M. B., Mitchell, H. K., Tissieres, A. Mendelian and non-Mendelian factors affecting the cytochrome system in *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 39,605–613, 1953.

7-37

А. Делеции, которые подавляют мутацию *pet494*, не затрагивают кодирующей части мРНК. Следовательно, они не приводят к изменению продукта гена *coxIII* и не могут влиять на его

стабильность. В отличие от этого замена нормального нетранслируемого 5'-участка одним из других генов полностью согласуется с изменением в трансляции. Из этих результатов следует, что продукт нормального гена *PET494* индуцирует трансляцию гена *coxIII* митохондриальной мРНК дикого типа.

- Б. Перестройка 5'-конца гена *coxIII* приводит к делеции важных митохондриальных генов, что в норме должно было дать цитоплазматический штамм *petite* у дрожжей. Все же эти штаммы содержат все обычные мРНК и очень хорошо растут. Из этого следует, что делетированная ДНК присутствует так или иначе в митохондриях. Оказалось, что штамм с супрессором *pet494* содержит митохондриальные геномы как дикого типа, так и с делецией. Хотя случается, что митохондрии содержат более чем одну молекулу ДНК, все же смесь таких молекул — это, по всей видимости, редкое явление. Такое состояние, называемое гетероплазматическим, обычно очень нестабильно, поскольку отдельные митохондриальные геномы быстро отделяются. Однако, выращивая клетки на глицероле, можно сохранить гетероплазматическое состояние в течение неопределенно долгого времени. В случае ядерной мутации *pet494* оба митохондриальных генома нужны для роста на глицероле: делетированный геном обеспечивает транслируемую мРНК для *coxIII*, а геном дикого типа — все другие продукты незаменимых генов.

Литература: Fox, T.D. Nuclear gene products required for translation of specific mitochondrially coded mRNAs in yeast. *Trends in Genetics* 2:97–100, 1986.

- 7-38 То, чего вы не учли в своем плане, — это как извлечь АТФ из *proto-Paracoccus*. Переносчик адениннуклеотида, естественно, отсутствует у всех свободноживущих бактерий, так как они должны удерживать АТФ внутри клетки, если от него есть какая-то польза. Во всех митохондриальных мембранах имеется АТФ/ADP-транслоказа, которая обеспечивает свободный обмен АТФ и ADP между цитоплазмой и митохондриальным матриксом. Только после приобретения этого переносчика синтезированный эндосимбионтом АТФ будет доступен для клетки-хозяина.

Литература: Whatley, J.M., John, P., Whatley, F.R. From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 204:165–187, 1979.

Внутриклеточная сортировка макромолекул и сохранение клеточных компартментов

Компартментация клеток высших организмов

8-1

- А. просвет (полость)
- Б. секреторные везикулы
- В. регулируемая; конститутивная
- Г. сигнальный пептид
- Д. сигнальные участки

8-2

- А. Правильно.
- Б. Неправильно. Мембраны внутриклеточных компартментов селективно (избирательно) проницаемы (не непроницаемы). Избирательная проницаемость обеспечивается за счет транспортных белков, которыми определяется химическое своеобразие каждого компартмента.
- В. Правильно.
- Г. Неправильно. Внутренняя сторона мембраны ЭР эквивалентна наружной стороне цитоплазматической мембраны, а внутренняя поверхность ядерной оболочки топологически эквивалентна цитозольной стороне плазматической мембраны.
- Д. Неправильно. Белки, предназначенные для митохондрий, хлоропластов, ядра или пероксисом, экспортируются из цитозоля; они никогда не поступают в ЭР.
- Е. Правильно.
- Ж. Правильно.
- З. Правильно.
- И. Неправильно. Сигнальные пептиды действительно используются, чтобы направлять белки в ЭР, митохондрии, хлоропласты и ядро, а сигнальные участки могут использоваться на других этапах сортировки, в том числе для узнавания определенных белков, направляемых в лизосомы.
- К. Правильно.
- Л. Неправильно. Информация, необходимая для создания ограниченных мембранами органелл, например ЭР или аппарата Гольджи, содержится не только в ДНК. В последней закодированы белки органелл. Для сборки необходима также эпигенетическая информация в форме хотя бы одного специфического белка. Эпигенетическая информация передается от родительской клетки клетке-потомку в виде самой органеллы.

8-3

- А. Если все белки, необходимые для образования одной плазматической мембраны клетки, проходят через ЭР каждые 24 ч,

а отдельные мембранные белки остаются в ЭР в течение 30 мин, то в нем всегда будет находиться 0,021 общего количества белков плазматической мембраны ($0,5 \text{ ч}/24 \text{ ч} = 0,021$). Поскольку поверхность мембраны ЭР в 20 раз больше, чем поверхность плазматической мембраны, то доля белков плазматической мембраны в ЭР будет равна $0,021/20 = 0,001$. Таким образом, соотношение между количеством белков плазматической мембраны и количеством других мембранных белков в ЭР составляет 1:1000. Из каждой тысячи белков, находящихся в мембране ЭР, только один переносится к плазматической мембране.

- Б. В клетке, которая делится один раз в сутки, через ЭР должны каждые 24 ч проходить также все белки, составляющие один аппарат Гольджи. Таким образом, если площадь мембран аппарата Гольджи втрое превышает площадь плазматической мембраны, то и количество их белков, одновременно представленных в ЭР, будет втрое больше. Следовательно, количественное отношение мембранных белков аппарата Гольджи к другим мембранным белкам в ЭР составит 3:1000.
- В. Если суммарная площадь мембран всех остальных компартментов клетки равна площади плазматической мембраны, то отношение мембранных белков, связанных с этими компартментами, к мембранным белкам ЭР равно 1:1000. Суммируя вклады всех компартментов, можно оценить отношение мембранных белков, проходящих через ЭР, к белкам, постоянно находящимся в мембране ЭР; оно составляет 5:1000. Таким образом, 99,5% белков в ЭР являются постоянными компонентами его мембраны.

Цитозоль

8-4

- А. цитоскелет
- Б. убикитин-зависимая; убикитин
- В. тепловой шок (стресс-ответ)

8-5

- А. Неправильно. Цитоскелет выполняет гораздо менее специфические функции. Специфичность же везикулярного транспорта обеспечивается в основном рецепторами, находящимися на наружной поверхности самих везикул.
- Б. Правильно.
- В. Правильно.
- Г. Неправильно. Регуляторные белки чаще всего короткоживущие; их концентрации могут быстро меняться за счет изменений в скорости синтеза.
- Д. Неправильно. Убикитин - это небольшой белок, который присоединяется к белку-мишени, маркируя его тем самым для последующей деградации под действием особой протеазы, зависимой от АТФ.
- Е. Неправильно. Последовательность оснований в гене определяет аминокислотную последовательность в синтезируемой белке. Однако N-концевая аминокислота и ряд других аминокислот часто отщепляются после синтеза. Таким образом, в функциональной форме белок в цитозоле часто имеет не точно такую последовательность аминокислот, какая определяется соответствующим геном.

8-6

- А. Хотя первый кодон β -галактозидазы можно было бы изменить, применив методы получения рекомбинантной ДНК, однако в измененном виде он не смог бы служить начальным участком трансляции. Трансляция всех белков, как у бактерий, так и у эукариот, начинается с остатка метионина на их N-конце. Во многих случаях остаток метионина отщепляется (изредка вместе с дополнительными аминокислотными остатками), в результате чего образуется новый N-конец полипептидной цепи. Однако правила модификации N-конца пока неясны. Таким образом, очень трудно создать белок с желаемым N-концом.

Методика, описываемая далее, была найдена случайно! Исследователей сначала интересовало, как убикитин, присоединившийся к N-концу какого-либо белка, вызывает его деградацию. Для решения этого вопроса они создали составной ген. У бактерий, не имеющих протеазы, зависящей от убикитина, составной белок, согласно ожиданиям исследователей синтезировался, однако в дрожжах та же плаزمид давала только β -галактозидазу, что свидетельствовало об отщеплении убикитина. Пытаясь предотвратить такое отщепление, исследователи изменили кодоны в участке соединения (используя метод рекомбинантных ДНК). Убикитин продолжал по-прежнему отщепляться, но образующаяся β -галактозидаза стала значительно отличаться по стабильности. Направление работы изменилось, и она привела к выяснению роли N-конца в стабильности белков.

- Б. Период полужизни различных β -галактозидаз можно оценить с помощью графика, представленного на рис. 8-2, Б, определив момент времени, когда остается половина молекул β -галактозидазы. Были идентифицированы три β -галактозидазы с разными периодами полужизни: R- β -галактозидаза—2 мин; I- β -галактозидаза—около 30 мин и M- β -галактозидаза—слишком большой период, чтобы его можно было измерить в данном опыте (на это понадобилось бы свыше 20 ч). Три указанные β -галактозидазы демонстрируют три класса стабильности, обнаруженные в этих экспериментах.

Литература: Bachmair, A., Finley, D., Varshavsky, A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. Science 234, 179–186, 1986.

8-7

- А. Отсутствие радиоактивности в полосе β -галактозидазы указывает на то, что антитела против убикитина не связались. Таким образом, полоса, отмеченная на рис. 8-2, А как β -галактозидаза, не содержит связанного убикитина, т.е. с N-конца гибридного белка он действительно удален.
- Б. Убикитин, располагающийся выше полосы β -галактозидазы (см. рис. 8-3), был присоединен к последней. Это можно утверждать, поскольку фермент очищали путем связывания с антителами, специфичными к β -галактозидазе. То обстоятельство, что убикитин присоединялся к двум нестабильным ферментам (но не связывался со стабильным ферментом), свидетельствует в пользу предположения о том, что убикитин маркирует белок для его последующей деградации. Лесенка следующих друг за другом полос указывает на то, что к разным молекулам β -галактозидазы присоединяется (по остаткам лизина) неодинаковое число молекул убикитина перед тем, как фермент подвергается деградации.

Литература: Bachmair, A., Finley, D., Varshavsky, A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. Science 234:179–186, 1986.

8-8

- А. Хотя орнитиндекарбоксилаза (ОДКаза) синтезировалась в нормальных и мутантных клетках с одной и той же скоростью, снижение ее активности в мутантных клетках происходило в 50 раз медленнее, чем в нормальных. Поскольку у мутанта этот фермент сохраняет активность значительно дольше, он может накапливаться в значительных количествах. Активность любого клеточного фермента зависит от равновесия между скоростью его синтеза (или активации) и скоростью его деградации (или инактивации). От соотношения скоростей накопления и потери зависит стационарный уровень ферментативной активности.
- Б. В своих опытах вы измеряли активность ОДКазы, но полученные данные не позволяют установить, что имеет место: деструкция фермента или обратимая инактивация. Чтобы разобраться в этом, необходимо определить количество белка ОДКазы. Уровень белка ОДКазы можно измерить, например, путем осаждения его специфическими антителами с последующим выделением с помощью электрофореза и окрашиванием, как описано для β -галактозидазы в задаче 8-6. После количественного определения белка ОДКазы оказалось, что уровень белка и ферментативная активность снижались параллельно друг другу с одинаковыми скоростями. Эти данные указывают на то, что в нормальных клетках фермент очень нестабилен.
- В. Поскольку периоды полужизни других белков в клетках мутантной линии остались прежними, то изменение этого параметра должно быть специфично именно для ОДКазы. Стабильность белка, по-видимому, зависит от вида N-концевого аминокислотного остатка. Следовательно, изменение периода полужизни ОДКазы могло произойти из-за того, что в сформированном N-конце терминальной стала другая аминокислота. (Такое изменение могло и не обнаружиться при исследовании структуры и ферментативных свойств ОДКазы, которое вы провели предварительно.) С другой стороны, возможно существует некая специальная «маркирующая» система, которая в норме метит молекулы ОДКазы для их деструкции. В этом случае линия мутантных клеток могла, по-видимому, утратить некоторые компоненты этой «маркирующей» системы.

Литература: Pritchard, M. L., Pegg, A. E., Jefferson, L. S. Ornithine decarboxylase from hepatoma cells and a variant cell line in which the enzyme is more stable. J. Biol. Chem. 257, 5892-5899, 1982.

Транспорт молекул белков и РНК в ядро и из ядра

8-9

- А. ядерная оболочка
Б. внутренняя ядерная; наружная (внешняя) ядерная
В. ядерные поры; поровый комплекс ядерной оболочки
Г. импорт в ядро

8-10

- А. Правильно.
Б. Неправильно. Липидные бислои внутренней и наружной ядерных мембран на краю каждой ядерной поры переходят один в другой.
В. Правильно.
Г. Неправильно. Для экспорта из ядра, судя по всему, тоже тре-

буются специальные системы узнавания и источники энергии, как и для импорта в ядро.

Д. Правильно.

8-11

- А. Часть молекулы нуклеоплазмина, ответственная за его вхождение в ядро, должна находиться в хвостовой части молекулы. Действительно, головки нуклеоплазмина не попадают в ядро при микроинъекции их в цитоплазму, а это единственный инъецированный фрагмент, не содержащий хвостовой части молекулы.
- Б. Результаты этих опытов позволяют предполагать, что хвостовая часть молекулы нуклеоплазмина несет сигнал для импорта в ядро и что накопление в ядре не обусловлено пассивной диффузией. Данные, полученные в тех вариантах опыта, где были инъецированы целые молекулы нуклеоплазмина или его фрагменты, содержащие хвостовой пептид, не позволяют сказать, какая из двух моделей верна; они указывают лишь на то, что хвост является важной частью молекулы нуклеоплазмина, т. е. что он несет сигнал для импорта или участок связывания. Решающие наблюдения, свидетельствующие против механизма пассивной диффузии, относятся к опытам с головками нуклеоплазмина. То, что они не накапливаются в ядре после инъекции в цитоплазму, можно было бы объяснить (в случае механизма пассивной диффузии) отсутствием участка связывания с неким ядерным компонентом. Если, однако, головка не содержит участка связывания, то она не могла бы оставаться в ядре и после введения непосредственно в него. Поскольку головка остается в ядре, можно было бы предположить, что ее размер слишком велик для прохождения через ядерную пору. Однако более крупные фрагменты нуклеоплазмина проходят через ядерные поры, поэтому возможность пассивной диффузии этого белка следует, по-видимому, исключить.

Литература: Dingwall, C., Sharnick, S. V., Laskey, R. A. A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell* 30, 449-458, 1982.

- 8-12 Смысл эксперимента заключается в том, что если рестриктаза EcoRI попадет в ядро, она будет расщеплять клеточную ДНК на части, что приведет к гибели клетки. В среде с глюкозой гибридный ген не транскрибируется и продукт его не образуется, поэтому клетки растут очень хорошо. Однако в присутствии галактозы гибридный ген экспрессируется. В дрожжевых клетках, несущих плазмиду pNL^- , которая кодирует нефункциональный сигнал для импорта в ядро, гибридный белок хотя и экспрессируется, но не может войти в ядро, поэтому он не вредит клетке. Однако в дрожжах с плазмидой pNL^+ , которая кодирует функциональный сигнал для импорта, гибридный белок попадает в ядро и разрезает клеточную ДНК, в результате чего клетки погибают.

Литература: Barnes, G., Rine, J. Regulated expression of endonuclease EcoRI in *Saccharomyces cerevisiae*: nuclear entry and biological consequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:1354-1358, 1985.

8-13

- А. Существенным недостатком вашего исходного плана является то, что белок-убийца, образовавшийся в клетках при высокой температуре, но не имеющий возможности проникнуть в ядро у мутантов (дефектных по механизму переноса), по-прежнему будет присутствовать в клетках и после перенесения их в условия

низкой температуры. Когда ядерный транспорт возобновится при пониженной температуре, белок-убийца начнет проникать в ядро, и мутантная клетка погибнет. Ваш первоначальный протокол гарантировал, что никакого нового белка-убийцы не должно образовываться (под влиянием сдвига температуры в сторону снижения и в присутствии глюкозы в среде), но в нем не учитывалось, что часть этого белка-убийцы уже была образована в присутствии галактозы, еще до снижения температуры.

- Б. Вам следует изменить свой экспериментальный протокол так, чтобы ранее синтезированный белок-убийца перешел бы в неактивную форму до того, как возобновится импорт в ядро. Для этого есть много путей. Например, можно оставить клетки при высокой температуре в среде с глюкозой (когда не идет новый синтез) в течение длительного срока, чтобы весь ранее синтезированный белок инактивировался в результате обычных процессов деградации. Можно было бы также попытаться увеличить скорость такой деградации, модифицировав N-конец белка-убийцы так, чтобы там оказалась дестабилизирующая аминокислота (см. задачу 8-6). Такая модификация могла бы превратить белок-убийцу в чрезвычайно короткоживущую молекулу, быстро исчезающую при отсутствии нового синтеза. И наоборот, можно было бы использовать чувствительный к температуре мутант, у которого EsoRI активна при высокой и неактивна при низкой температуре. Такой чувствительный к холоду белок окажется активным, когда ядерный транспорт подавлен, и неактивным, когда транспорт возобновляется.
- В. Есть несколько типов мутантов, которые, по-видимому, могли бы выжить в ходе отбора, не претерпевая изменений в механизме ядерного транспорта. Например, у мутантов с нарушением транспорта галактозы в клетку гибридный ген не действовал бы, и в результате они выжили бы при повышении температуры в присутствии галактозы. Выжили бы в процессе отбора и мутанты с гибридным геном, у которых отсутствовала бы экспрессия EsoRI. Это могли быть клетки, которые содержат мутации в промоторе (препятствующие экспрессии гибридного гена), или мутации в EsoRI-части гибридного гена (делающие EsoRI неактивной), или же мутации в той области гибридного гена, которая ответственна за сигнал для импорта в ядро (препятствующие импорту EsoRI в ядро).

Схемы генетического отбора редко бывают абсолютно специфичными для искомого мутанта. В некоторых случаях могут быть предсказаны, а затем выявлены и другие классы мутантов. В действительности, однако, наиболее увлекательная сторона генетического отбора, которая придает ему сходство с охотой за сокровищами, как раз и заключается в том, что часто можно выявить такие классы мутантов, которые вы и не предполагали обнаружить. Иногда они оказываются тривиальными и неинтересными; однако попадаются также чрезвычайно интересные и информативные мутанты, благодаря которым можно открыть нечто совершенно неожиданное.

Транспорт белков в митохондрии и хлоропласты

8-14

- А. матрикс; внутренняя мембрана; межмембранное пространство; наружная (внешняя) мембрана

- Б. тилакоидная мембрана; тилакоидное пространство
- В. митохондриальные белки-предшественники
- Г. участки контакта
- Д. тилакоид

8-15

- А. Неправильно. Белки, закодированные в геноме митохондрий, действительно локализованы в основном во внутренней митохондриальной мембране, однако белки, закодированные в геноме хлоропластов, локализованы главным образом в тилакоидной мембране.
- Б. Неправильно. Митохондриальные сигнальные пептиды представляют собой амфипатические спиральные структуры с положительно заряженными аминокислотами на одной стороне и незаряженными гидрофобными аминокислотами на другой стороне спирали.
- В. Правильно.
- Г. Правильно.
- Д. Правильно.
- Е. Правильно.
- Ж. Неправильно. Через поры в наружной мембране митохондрий свободно проходят лишь молекулы с мол. массой ниже 10 000 Да. Большинство белков имеют более крупные размеры, поэтому наружная мембрана представляет собой преграду для их проникновения.
- З. Неправильно. В митохондриях электрохимический протонный градиент используется как движущая сила для импорта белков. В хлоропластах же такой градиент генерируется на тилакоидной мембране, поэтому он не может использоваться для импорта белков через наружную и внутреннюю мембраны.

- 8-16 Обычно трансляция происходит гораздо быстрее, чем импорт в митохондрии, так что синтезированные белки полностью отделяются от рибосомы, прежде чем начинают взаимодействовать с мембраной митохондрии. Когда белковый синтез блокирован циклогексимидом, скорость трансляции становится ниже скорости импорта. Поскольку сигнальный пептид для импорта белка в митохондрию расположен на его N-конце, то некоторые из частично синтезированных митохондриальных белков, все еще прикрепленные к рибосомам, могут в этих условиях взаимодействовать с митохондриальной мембраной. В результате начавшийся импорт даже одного такого белка приводит к прикреплению рибосомы и связанной с ней мРНК (а также других рибосом, транслирующих ту же молекулу мРНК) к митохондриальной мембране.

Литература: Kellems, R.E., Allison, V.F., Butow, R.A. Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. J. Cell Biol. 65, 1-14, 1975.

- 8-17 Как показано на рис. 8-21, пептиды 1 и 2 способны к образованию амфипатических спиралей с гидрофобными аминокислотами на одной стороне и гидрофильными — на другой стороне спирали. Однако пептид 1 несет несколько отрицательно заряженных аминокислот на своей гидрофильной стороне и поэтому вряд ли может служить сигнальным пептидом для импорта в митохондрию. Только пептид 2 имеет положительно заряженную гидрофильную сторону спирали, поэтому именно он, вероятно, служит

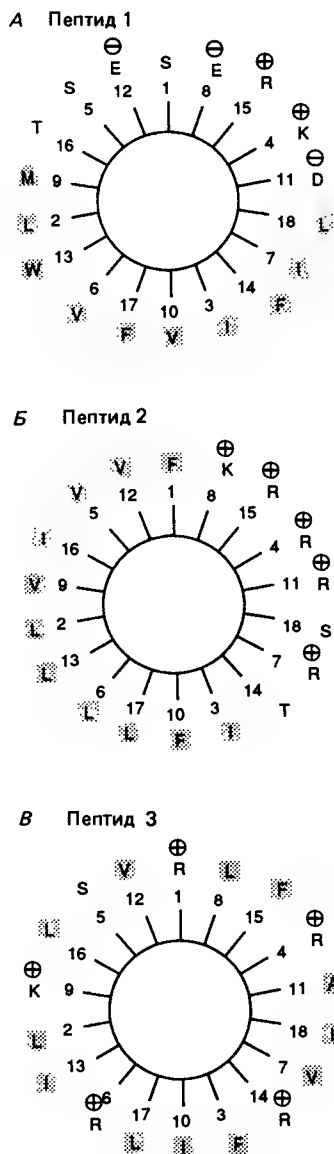


Рис. 8-21. Спирально-круговые проекции трех пептидов (ответ 8-17). Гидрофобные аминокислоты отмечены затемненными квадратами; заряды на заряженных аминокислотах указаны в кружках; незаряженные гидрофильные аминокислоты не имеют дополнительных обозначений.

сигнальным пептидом для импорта митохондриальных белков. Пептид 3 несет положительный заряд, но не может служить сигналом для митохондриального импорта, так как гидрофильные и гидрофобные аминокислоты расположены в нем попеременно.

8-18

- А. Импорт всех четырех белков в хлоропласты в вашем опыте происходил очень эффективно, о чем свидетельствует малая величина фракции предшественника (рис. 8-8, Б, верхняя полоса, дорожка 2), которая остается после инкубации с хлоропластами. Эта небольшая фракция предшественника находится вне хлоропластов во всех случаях, поскольку она подвергается воздействию протеазы (рис. 8-8, Б, дорожка 3).
- Б. В вашем опыте ферредоксин локализован в своем обычном компартменте судя по избытку его во фракции стромы (рис. 8-8, Б, ФДФД, дорожка 5) и отсутствию в других фракциях. Пластоцианин также локализован в своем обычном компартменте — просвете тилакоида, поскольку большая часть его связана с тилакоидами (рис. 8-8, Б, ПЦПЦ, дорожка 6, нижняя полоса) таким образом, что он не может расщепляться добавленной протеазой (рис. 8-8, Б, ПЦПЦ, дорожка 7).
- В. Гибридные белки импортируются в те компартменты хлоропласта, которым соответствуют их N-концевые последовательности. Этот результат наиболее очевиден для ФДПЦ, который локализован исключительно во фракции стромы (рис. 8-8, Б, ФДПЦ, дорожка 5), как и ферредоксин. В отличие от этого лишь небольшая доля ПЦФД входит в просвет тилакоида (рис. 8-8, Б, ПЦФД, дорожка 6, нижняя полоса). По-видимому, некоторое количество этого белка связывается с мембраной тилакоидов, поскольку он расщепляется при обработке протеазой (рис. 8-8, Б, сравните верхние полосы дорожек 6 и 7); однако большая часть его обнаруживается во фракции стромы (рис. 8-8, Б, дорожка 5).
- Имеется ряд причин, по которым импорт ПЦФД в просвет тилакоида может быть неэффективным. 1) Может быть затруднено проникновение домена ферредоксина через тилакоидную мембрану. Он, однако, проходит через наружную и внутреннюю мембраны, а его общий заряд практически равен заряду пластоцианина, который преодолевает тилакоидную мембрану. 2) Железосерный центр обычно включается в ферредоксин на определенном этапе созревания молекулы. Таким образом, возможно, что этот центр присоединяется в строме и по этой причине ферредоксин не может пересечь мембрану тилакоида. 3) Ферредоксин обычно функционирует в строме в комплексе с другими белками. Возможно, что домен ферредоксина в ПЦФД связывается с этими белками и остается таким образом в строме. Эти соображения часто усложняют интерпретацию экспериментов такого рода, направленных на выявление сигнальных участков для импорта белков.
- Г. Множественные полосы в ваших опытах — это ключ к пониманию импорта белков в хлоропласты. Самая верхняя полоса для всех белков — это предшественник, т. е. первичный продукт трансляции, поскольку он присутствует в реакционной смеси при трансляции *in vitro* в отсутствие хлоропластов (рис. 8-8, Б, дорожка 1). Полосы, расположенные ниже, содержат белки, от которых отделилась часть молекулы. Вы ожидали, что пептид должен отщепляться с N-конца (это то, из-за чего задумывался весь эксперимент), и результаты действительно подтверждают, что сигнальные пептиды локализованы на N-конце. Две полосы при электрофорезе

обнаруживаются в том случае, когда N-концевой сегмент происходил из ферредоксина (рис. 8-8, Б, ФДФД и ФДПЦ, дорожка 2), а картина с тремя полосами наблюдается в том варианте опыта, где N-концевой сегмент происходил из пластоцианина (рис. 8-8, Б, ПЦПЦ и ПЦФД, дорожка 2).

Наличие только двух полос в случае белков, несущих сигнальный пептид для ферредоксина, указывает на то, что импорт ферредоксина в строму сопровождается одним актом отщепления. Нижняя полоса соответствует функциональной форме ферредоксина в строме (ср. ФДФД, ФДПЦ, дорожки 2 и 5). Образование трех полос в случае белка с сигнальным пептидом для пластоцианина свидетельствует о том, что при импорте этого белка в просвет тилакоида происходят два последовательных расщепления пептидной связи. Самая нижняя полоса соответствует функциональной форме пластоцианина в тилакоиде (ср. ПЦПЦ, ПДФД, дорожки 2 и 7). Промежуточная полоса относится, вероятно, к промежуточной стадии импорта и указывает на то, что сигнальный пептид содержит два компонента, которые отщепляются последовательно. N-концевой компонент сигнального пептида направляет белок в строму, а С-концевой компонент того же пептида — в просвет тилакоида.

Д. Модель, суммирующая роль сигнальных пептидов в импорте ферредоксина и пластоцианина в соответствующие компартменты хлоропластов, изображена на рис. 8-22. Для каждого белка сигнальный пептид показан как прямоугольник на N-конце белка. Зачерненная часть прямоугольника соответствует той части сигнального пептида, которая необходима для импорта через наружную и внутреннюю мембраны хлоропласта. Этот сигнальный пептид отделяется, когда белок пересекает мембрану и входит в строму. Незачерненная часть прямоугольника, связанная с пластоцианином, нужна для импорта через тилакоидную мембрану. Она удаляется при импорте в полость тилакоида.

Литература: *Smeekeens, S., Bauerle, C., Hageman, J., Keegstra, K., Weisbeek, P.*

The role of the transit peptide in the routing of precursors toward different chloroplast compartment. *Cell* 46, 365–375, 1986.

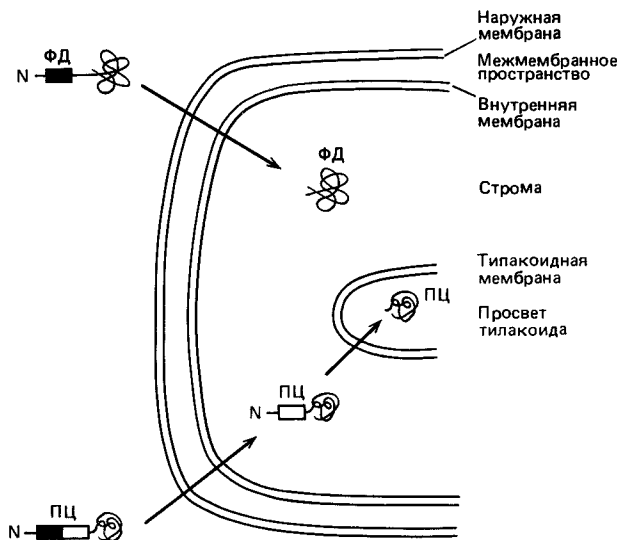


Рис. 8-22. Схема, иллюстрирующая роль сигнальных пептидов в направлении транспорта ферредоксина и пластоцианина к соответствующим компартментам в хлоропласте (ответ 8-18).

Пероксисомы

8-19

- А. пероксисомы
- Б. глиоксилатный цикл; глиоксисомы

8-20

- А. Неправильно. За редким исключением, как, например, в случае эритроцитов, все клетки млекопитающих имеют в своем составе пероксисомы, а для немногих типов клеток характерны крупные пероксисомы.
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. Новые пероксисомы возникают из ранее существовавших в результате роста и деления органелл. Все мембранные белки и липиды пероксисом поступают из цитозоля.

8-21

- А. Результаты опытов по гибридизации, представленные на рис. 8-9, показывают, что мРНК генов 1 и 3 для ФГК экспрессируются у трипаносом из человека, а мРНК генов 1 и 2 для ФГК - у трипаносом из мухи цеце.
- Б. Гликосомная форма ФГК экспрессируется только в трипаносомах, выделенных из организма человека. Поскольку олигонуклеотидный зонд к гену 3 для ФГК гибридизуется с мРНК, которая экспрессируется только в трипаносомах из человека, можно сделать вывод, что ген 3 для ФГК, по-видимому, кодирует гликосомную форму ФГК.
- В. Результаты, представленные на рис. 8-9, указывают на то, что неточность сортировки не является причиной слабой активности цитозольной ФГК в трипаносомах из человека. Ген 1 для ФГК экспрессируется на низком уровне как в трипаносомах из человека, так и в трипаносомах из мухи цеце. Поскольку вся активность ФГК у трипаносом из мухи цеце обнаруживается в цитозоле, то ген 1 для ФГК должен кодировать цитозольную форму ФГК. Ген 1 для ФГК экспрессируется в трипаносомах из человека, поэтому он, вероятно, ответствен за слабую активность ФГК в цитозоле трипаносом из человека. Таким образом, нет данных в пользу того, что импорт в гликосомы в трипаносомах из человека является неточным.

Литература: *Osinga, K. A., Swinkels, B. W., Gibson, W. C., Borst, P., Veeman, G. H., Van Boom, J. H., Michels, P. A. M., Opperdoes, F. R.* Topogenesis of microbody enzymes: sequence comparison of the genes for the glycosomal (microbody) and cytosolic phosphoglycerate kinases of *Trypanosoma brucei*. EMBO J. 4, 3811 - 3817, 1985.

- 8-22 В результате слияния клеток от больных с синдромом Целлвегера, имеющих дефекты в разных генах, в гибридной клетке были бы представлены все белки, обычно связанные с пероксисомами. Если пероксисомы возникают из эндоплазматического ретикулума, они должны образовываться в слившихся клетках, поскольку все необходимые белки в последних представлены. Если, однако, пероксисомы возникают только из уже существующих пероксисом, то в гибридных клетках пероксисомы не будут образовываться, так как ни в одной из родительских клеток пероксисомы не содержатся.

Заметьте, что эксперимент позволяет сделать выбор между этими двумя гипотезами только в том случае, если сливающиеся

клетки дефектны по *разным* генам. Если клетки имеют дефект в одном и том же гене, то после слияния пероксисомы не должны образовываться, независимо от того, какая из гипотез верна, если вообще какая-нибудь из них справедлива.

Литература: Borst, P. How proteins get into microbodies (peroxisomes, glyoxysomes, glycosomes). Biochim. Biophys. Acta 866:179–203, 1986.

Эндоплазматический ретикулум

8-23

- А. эндоплазматический ретикулум (ЭР); просвет (полость) ЭР (внутреннее пространство цистерн ЭР)
- Б. мембраносвязанные рибосомы; шероховатый (гранулярный) ЭР
- В. промежуточные районы
- Г. саркоплазматический ретикулум
- Д. микросомы
- Е. сигнальная гипотеза
- Ж. частица, распознающая сигнал (SRP—от англ. signal recognition particle); SRP-рецептор
- З. сигнальная пептидаза
- И. пептид начала переноса; пептид конца переноса
- К. связывающий белок (BiP)
- Л. протеиндисульфидизомераза
- М. гликопротеины
- Н. гликозилирование; долихол

8-24

- А. Правильно.
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. Ферменты семейства цитохрома Р450 не расщепляют токсичные соединения и метаболиты на мелкие фрагменты. Напротив, для обезвреживания молекул они катализируют присоединение к этим веществам гидроксильных групп. Эти группы служат участками присоединения водорастворимых компонентов (например, сульфата или глюкуроновой кислоты). В итоге молекула-мишень становится достаточно растворимой, чтобы выводиться с мочой.
- Г. Неправильно. Шероховатые микросомы—более плотные, чем гладкие микросомы, потому что прикрепленные к ним рибосомы содержат большое количество РНК.
- Д. Правильно.
- Е. Правильно.
- Ж. Неправильно. К остановке трансляции приводит связывание частицы, узнающей сигнал, с сигнальным пептидом. Блокада трансляции снимается, когда рибосомы, несущие SRP, связываются с SRP-рецепторами, расположенными на поверхности шероховатого ЭР со стороны цитозоля.
- З. Неправильно. Для импорта белков в ЭР требуется гидролиз АТФ, а не продолжающийся белковый синтез.
- И. Правильно.
- К. Правильно.
- Л. Правильно.
- М. Неправильно. В просвете ЭР не содержатся восстанавливающие агенты (они присутствуют в цитозоле), и, следовательно, в ЭР могут возникать (S—S)-связи.
- Н. Правильно.

- О. Неправильно. Белки, связанные с гликозилированными молекулами фосфатидилинозитола, прикреплены к наружной поверхности плазматической мембраны. Реакция присоединения протекает в просвете ЭР, а внутренняя поверхность мембраны ЭР топологически эквивалентна наружной поверхности клетки.
- П. Правильно.
- Р. Неправильно. Транспортные везикулы переносят новые фосфолипиды в плазматическую мембрану, аппарат Гольджи и лизосомы, однако в митохондриях и пероксисомы новые фосфолипиды переносятся с помощью белков-переносчиков фосфолипидов.

8-25

- А. В отсутствие микросом синтезируется один-единственный белок (рис. 8-10, дорожка 1). Он доступен для расщепления протеазой независимо от присутствия детергента (рис. 8-10, дорожки 2 и 3), следовательно, он не защищен мембранным бислоем. Обработка белка эндогликозидазой Н не влияет на его электрофоретическую подвижность (рис. 8-10, дорожка 4), что указывает на отсутствие в нем N-связанных сахаров, присоединяемых в ЭР.
- Б. Если судить по трем критериям (защищенность от действия протеазы, наличие N-связанных сахаров и отщепляемого сигнального пептида), этот белок переносится через микросомную мембрану. 1) Белок полностью чувствителен к протеазе в присутствии детергента (рис. 8-10, дорожка 7), но только частично чувствителен к протеазе в отсутствие детергента (рис. 8-10, дорожка 6). Таким образом, белок частично защищен от протеазы в присутствии микросом. 2) Скорость миграции белка возрастает после обработки его эндогликозидазой Н (рис. 8-10, ср. дорожки 5 и 8), следовательно, сахара связываются с белком, когда он транслируется в присутствии микросом. 3) Когда сахара удалены, белок движется при электрофорезе быстрее, чем белок-предшественник (рис. 8-10, ср. дорожки 1 и 8). Это происходит из-за того, что часть белка – по-видимому, его сигнальный пептид – отщепляется от предшественника, когда он транслируется в присутствии микросом.
- В. Частичная чувствительность белка к протеазе (рис. 8-10, дорожка 6) показывает, что часть молекулы белка остается на наружной поверхности микросом. Вместе с данными об отщеплении сигнального пептида и присоединения N-связываемых сахаров этот результат доказывает, что белок пронизывает мембрану. Таким образом, белок погружен в мембрану только частично и в основном закорен в ней своим сегментом «конца переноса».

8-26

- А. Если трансляция происходит в присутствии микросом, в них активно переносятся белки, транслируемые с каждой из мРНК. Это заключение основано на результатах обработки протеазой и эндо-Н. Новосинтезированные белки защищены от действия протеазы, что схематически изображено на рис. 8-12, где белки представлены на всех дорожках с номером 2. При этом все новосинтезированные белки ковалентно связаны с углеводами, что подтверждается увеличением их электрофоретической подвижности после обработки ферментом эндо-Н (рис. 8-12, ср. дорожки 3 и 1 для каждой мРНК).
- Б. Транслокация белков, транслируемых с коротких и средних по размеру мРНК, не сопряжена с трансляцией, так как эти белки могут переноситься в микросомы, добавленные после завершения

трансляции. Их перенос в микросомы подтверждается устойчивостью к действию протеазы и чувствительностью к эндо-Н (рис. 8-12 А и Б, дорожки 5 и 6). Белок, синтезированный на длинной мРНК, не переносится, если микросомы добавлены после завершения трансляции. На это указывают измененная электрофоретическая подвижность в отсутствие какой-либо обработки (рис. 8-12 В, ср. дорожки 1 и 4), а также чувствительность белка к протеазе (рис. 8-12 В, дорожка 5) и его неизменная подвижность после обработки эндо-Н (рис. 8-12 В, ср. дорожки 4 и 6).

В. Поскольку транслокация может быть разобщена с трансляцией, она не может осуществляться путем проталкивания синтезируемого полипептида рибосомой. Таким образом, полученные вами экспериментальные результаты больше согласуются с представлением о том, что белки протягиваются через мембрану с помощью механизма переноса. Как было показано на разобщенных системах, подобных описанной выше, этот механизм сам по себе требует затрат энергии (АТР) независимо от затрат энергии на трансляцию.

Г. Разобщение транслокации и трансляции в случае более коротких молекул белков указывает на то, что соответствующий сигнальный пептид может направить белок через мембрану ЭР в отсутствие одновременно протекающего белкового синтеза. Почему же в таком случае более длинная молекула белка не проходит сквозь мембрану в отсутствие трансляции? Одно из возможных объяснений этого явления может заключаться в том, что сигнальный пептид становится стерически недоступным для механизма транслокации при сложной пространственной укладке полипептидной цепи.

Литература: *Perara, E., Rothman, R. E., Lingappa, V. R.* Uncoupling translocation from translation: implications for transport of proteins across membranes. *Science* 232: 348–352, 1986.

8-27 Возможное расположение белков в мембране ЭР схематически изображено на рис. 8-23. Оно согласуется с правилами котрансляционного встраивания белков в мембраны. В каждом случае пептиды «начала переноса» соответствуют нечетным сегментам, пронизывающим мембрану, а пептиды «конца переноса» соответствуют четным сегментам белка, пронизывающим мембрану. Все пептиды «начала переноса» обращены своими N-концами в сторону цитоплазмы, а С-концами – в просвет ЭР. Все пептиды «конца переноса» обращены своими N-концами к просвету ЭР, а С-концами – в цитоплазму. Лидерные пептиды (первые сегменты, пересекающие мембрану) отщеплены от белков (рис. 8-23, А и Г).

8-28

А. График гидропатии указывает на наличие трех гидрофобных сегментов: 1–25, 75–100 и 185–210 аминокислотных остатков. В соответствии с правилами котрансляционного встраивания должна возникать конструкция белка, показанная на рис. 8-24, А. Таким образом, домен белка между сегментами 1 и 2, пронизывающими мембрану, должен находиться в периплазматическом пространстве; домен между сегментами 2 и 3, пронизывающими мембрану, должен находиться в цитоплазме, а домен, следующий за сегментом 3, должен выходить в периплазматическое пространство. С этим предсказанием согласуются данные по активности щелочной фосфатазы. Активность высока у продуктов плазмид 1, 2, 5 и 6, т. е. в тех случаях, когда ген щелочной

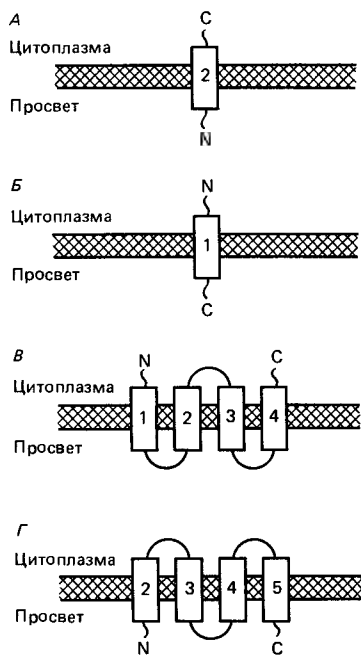


Рис. 8-23. Расположение белков в мембране ЭР (ответ 8-27). Прямоугольники с номерами соответствуют сегментам, пронизывающим мембрану (см. рис. 8.13).

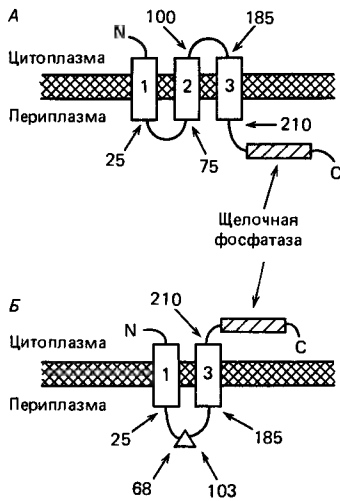


Рис. 8-24. Расположение нормальной (А) и делетированной (Б) форм белка в бактериальной мембране (ответ 8-28). Сегменты, пронизывающие мембрану, обозначены прямоугольниками с номерами от 1 до 3 в соответствии с гидрофобными областями на графике гидропатии (рис. 8-14). Числами обозначены аминокислоты.

фосфатазы соединен с генами для доменов белка, которые должны находиться в периплазматическом пространстве. В то же время продукты плазмид 3 и 4, в которых ген щелочной фосфатазы соединен с геном для домена белка, располагающегося в цитоплазме, обнаруживают низкую активность щелочной фосфатазы.

- Б. Делеция кодонов в области от 68-й до 103-й аминокислот приводит к исчезновению сегмента, пронизывающего мембрану. Если правила для котрансляционного встраивания верны, то домен белка между двумя остальными сегментами, проходящими сквозь мембрану (сегменты 1 и 3), должен теперь находиться в периплазматическом пространстве, а участок белка, следующий за последним мембранным сегментом, должен попасть в цитоплазму (рис. 8-24, Б). Активности гибридных белков вновь соответствуют ожидаемому; плазмиды 3* и 4*, в которых должна быть закодирована щелочная фосфатаза, попадающая в периплазматическую область, дают высокую активность, а плазмиды 5* и 6*, которым должно соответствовать расположение щелочной фосфатазы со стороны цитоплазмы, дают низкую активность. Таким образом, для этого мембранного белка применение правил котрансляционного встраивания на основе графика гидропатии позволяет предсказать организацию белка в мембране.
- В. Относительное расположение N- и C-концов зрелого белка нельзя выявить с помощью правил котрансляционного встраивания, поскольку недостает самой важной информации: отщепляется ли сигнальный пептид? Если этого не происходит, N- и C-концы будут располагаться на противоположных сторонах мембраны (как показано на рис. 8-24, А); если же он отщепляется, они будут находиться на одной стороне мембраны (оба в периплазматическом пространстве).

Литература: Manoil, C., Beckwith, J. A genetic approach to analyzing membrane protein topology. Science 233: 1403-1408, 1986.

8-29

- А. С помощью опыта 1 проверяли, создан ли в условиях опыта избыток мембран-акцепторов (тений эритроцитов). Поскольку белок, переносящий ФХ, катализирует реакцию обмена, то можно легко определить теоретический предел для величины переноса при равновесии. Если, например, количество донорных и акцепторных мембран одинаково, то предел возможного переноса должен быть на уровне 50%. При удвоении количества мембран-акцепторов этот предел увеличится до 67% (отношение акцептор: донор равно 2:1); при увеличении количества мембран-акцепторов втрое по сравнению с количеством мембран-доноров предел увеличится до 75% (отношение 3:1) и т. д. Когда увеличение фракции акцепторных мембран перестает вызывать изменения, можно считать, что мембраны эритроцитов присутствуют в избытке. Таким образом, 70%-ный предел не относится к положению равновесия при обмене. Опыт 2 позволяет исключить возможность инактивации фермента в ходе реакции, поскольку добавление свежего белка-переносчика не приводило к возрастанию обмена. Опыт 3 позволяет исключить возможность того, что меченый материал с самого начала содержал примеси (они не могли бы переноситься ФХ-переносящим белком, специфичным только для ФХ) или как-то изменялся в процессе инкубации.
- Б. Одно из простых объяснений 70%-ного предела заключается в том,

что ФХ-переносящий белок транспортирует этот фосфолипид только от наружного монослоя бислойной мембраны везикулы. Площадь наружной поверхности донорной везикулы в 2,5 раза больше, чем площадь ее внутренней поверхности.

Поверхность сферы равна $4/3\pi r^2$. Таким образом, отношение площадей наружной и внутренней поверхностей донорной везикулы равно отношению квадратов их радиусов: $10,5^2 / (10,5 - 4,0)^2 = 2,5$. Поскольку наружная поверхность больше внутренней в 2,5 раза, то в наружном монослое будет находиться 71% липидов (2,5/3,5). Таким образом, 70%-ный перенос близок к ожидаемому пределу, если белок-переносчик обменивает ФХ только от наружного монослоя и если не происходит перескока ФХ поперек мембраны.

- В. Если белок-переносчик обменивает ФХ только между наружными монослоями мембран, то метка в акцепторных мембранах эритроцитов будет целиком в наружном слое, и поэтому будет полностью доступна для переноса. Данный результат указывает на то, что ФХ-переносящий белок транспортирует фосфолипид только между наружными монослоями.

Литература: Rothman, J. E., Dawidowicz, E. A. Asymmetric exchange of vesicle phospholipids catalyzed by the phosphatidylcholine exchange protein. Measurement of inside-outside transitions. Biochemistry 14:2809–2816, 1975.

Аппарат Гольджи

8-30

- А. аппарат Гольджи (комплекс Гольджи)
- Б. *цис*-сторона; *транс*-сторона
- В. N-связанные олигосахариды
- Г. высокое содержание маннозы; сложные
- Д. гликозилирование по типу O-связывания
- Е. *цис*-; *промежуточный*; *транс*-
- Ж. *транс*-сеть Гольджи
- З. окаймленные везикулы

8-31

- А. Правильно.
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. Функция N-связанных олигосахаридов неизвестна, но очевидно, что они не влияют на перенос через ЭР и аппарат Гольджи. Яды, блокирующие гликозилирование, обычно не влияют на транспорт белков через ЭР и аппарат Гольджи.
- Г. Правильно.
- Д. Правильно.
- Е. Правильно.

8-32

- А. Радиоактивно меченный N-ацетилглюкозамин присоединяется в *промежуточном* компартменте аппарата Гольджи, а осаждение лектином зависит от присутствия галактозы, которая присоединяется в *транс*-компартменте. Следовательно, в этом опыте обнаруживается движение вещества между *промежуточным* компартментом и *транс*-компартментом аппарата Гольджи.
- Б. Если бы белки двигались по аппарату Гольджи за счет продвижения цистерн, то белок, вошедший в аппарат Гольджи в мутантной клетке, мог бы остаться в данной стопке цистерн

и дойти до состояния зрелости в процессе движения вновь образовавшейся цистерны по стопке. Таким образом, модель перемещающихся цистерн предсказывает, что ни один из меченых G-белков (они метились в *промежуточном* компартменте аппарата Гольджи в мутантной клетке) не должен соединяться с галактозой (это могло произойти только в аппарате Гольджи клетки дикого типа). По этой модели результат слияния неинфицированных мутантных клеток с неинфицированными клетками дикого типа (нормальными клетками) (табл. 8-2, вариант 1) должен быть таким же, как в случае слияния инфицированных и неинфицированных мутантных клеток (табл. 8-2, вариант 2). Наоборот, если какое-либо вещество проходит через аппарат Гольджи за счет транспорта везикул, то белки внутри везикул могли бы перемещаться между отдельными стопками. Однако в везикулярно-транспортной модели скорость перемещения везикул между различными стопками аппарата Гольджи не устанавливается. Модель транспорта в везикулах предсказывает только то, что часть меченого G-белка может захватить галактозу во время перемещения между стопками цистерн. По этой модели при слиянии инфицированных мутантных клеток с неинфицированными клетками дикого типа (табл. 8-2, вариант 1) к G-белку должно присоединиться больше галактозы, чем при слиянии инфицированных и неинфицированных мутантных клеток (табл. 8-2, вариант 2), но меньше, чем при слиянии инфицированных и неинфицированных клеток дикого типа (табл. 8-2, вариант 3).

- В. Результаты, приведенные в табл. 8-2, подтверждают модель везикулярного транспорта, поскольку почти к половине молекул меченого G-белка присоединялась галактоза. Такая величина связывания достаточно неожиданна, поскольку она указывает на то, что как только везикула отделяется от цистерны, ее шансы слиться с цистерной в той же или в другой стопке Гольджи практически одинаковы. В ряде других контрольных опытов было показано, что морфология стопок Гольджи не изменялась при слиянии, стопки Гольджи мутантного и дикого типа оставались отделенными друг от друга и G-белок действительно перемещался в стопку Гольджи дикого типа.

Литература: Rothman, J. E., Miller, R. L., Urbani, L. J. Intercompartmental transport in the Golgi complex is a dissociative process: facile transfer of membrane protein between two Golgi populations. J. Cell Biol. 99: 260–271, 1984.

8-33

- А. В таблице 8-6 линии мутантных клеток расположены в таком порядке, который соответствует этапам процессинга N-связанных олигосахаридов. Типы сахаров и их количество в составе N-связанных олигосахаридов позволяют определить, какой этап процессинга затронут мутацией (см. МБК, рис. 8-63).
- Б. Локализация этапа процессинга, по которому дефектен каждый из мутантов, отмечена в табл. 8-6 (см. МБК, рис. 8-63). Заметьте, что у мутанта G олигосахарид образовывался в ЭР, а этап, на котором блокировался процессинг (т.е. следующая ступень), относится к аппарату Гольджи.
- В. Ферменты процессинга модифицируют N-связанный олигосахарид по одному из двух основных путей: они отщепляют или, наоборот, присоединяют сахара. У мутантов C, H, D, G и B дефекты относятся к этапам отщепления сахаров, вероятно, к самим ферментам процессинга. У мутантов E, F, A и I имеются дефекты на

Таблица 8-6. Линии мутантных клеток и клеток дикого типа, расположенные соответственно этапам процессинга олигосахаридов (ответ 8-33)

Клеточная линия	Man	GlcNAc	Gal	NANA	Glc	Локализация
Мутант С	9	2	0	0	3	ЭР
Мутант Н	9	2	0	0	2	ЭР
Мутант D	9	2	0	0	0	ЭР
Мутант G	8	2	0	0	0	Гольджи
Мутант E	5	2	0	0	0	Гольджи
Мутант В	5	3	0	0	0	Гольджи
Мутант F	3	3	0	0	0	Гольджи
Мутант А	3	4	0	0	0	Гольджи
Мутант I	3	4	2	0	0	Гольджи
Дикий тип	3	4	2	2	0	

В колонке «Локализация» указано, где должен осуществляться тот этап процессинга, в котором имеется дефект.

этапах присоединения сахаров. Эти мутанты могут быть дефектны по ферментам процессинга, но возможно, что их дефекты относятся к одному из ферментов, ответственных за синтез моносахаридов, или к ферменту, ответственному за активацию сахара перед его присоединением (например, к ферменту, синтезирующему UDP-N-ацетилглюкозамин – активированную форму N-ацетилглюкозамина), или же к белкам, ответственным за транспортировку моносахаридов в просвет ЭР либо в аппарат Гольджи.

8-34

- А. Модифицированные G-белки, в которых сегменты, пронизывающие мембрану, содержат 12, 8 или 0 аминокислотных остатков, не доходят до плазматической мембраны (табл. 8-4). Присутствие олигосахаридов указывает на то, что каждый из этих белков погружен в мембрану ЭР. Этого следовало ожидать, поскольку сигнальный пептид остался без изменений. Наличие короткого С-концевого домена у тех белков, сегменты которых состоят из 12 или 8 аминокислотных остатков, показывает, что эти белки закреплены в мембране почти как нормальный G-белок. Напротив, полная устойчивость к протеазе G-белка, у которого трансмембранный сегмент отсутствует, доказывает, что белок полностью прошел через мембрану ЭР и находится в просвете ЭР. Таким образом, G-белки с сегментами из 12 и 8 аминокислотных остатков удерживаются во внутреннем слое мембраны, а G-белок без этого сегмента локализован в просвете ЭР.

Частичная устойчивость G-белка, у которого трансмембранный сегмент состоит из 12 аминокислот, к ферменту эндо-Н свидетельствует о том, что некоторая фракция такого G-белка доходит до *промежуточного* компартмента аппарата Гольджи, где происходит модификация углеводов в составе белка, в результате которой олигосахарид становится устойчивым к ферменту эндо-Н. Остальные молекулы этого белка находятся в мембране ЭР либо в *цис*-компартменте аппарата Гольджи. Чувствительность к эндо-Н G-белка с сегментом из 8 аминокислотных остатков или без этого сегмента показывает, что такие белки не могут пройти через *цис*-компартмент аппарата Гольджи или вообще не могут выйти из ЭР.

- Б. Для G-белка VSV минимальная длина трансмембранного сегмента, по-видимому, составляет 8 аминокислотных остатков или даже меньше; это видно из того, что трансмембранный сегмент всего из 8 аминокислотных остатков закреплял модифицированный G-белок практически так же, как закреплен нормальный G-белок. Этот результат удивителен тем, что цепочка из 8 аминокислотных остатков, уложенная в структуру типа α -спирали, казалось бы недостаточно длинна, чтобы пересечь мембрану по толщине. Имеется несколько возможностей: короткие сегменты, проходящие сквозь мембрану, могут быть полностью вытянуты, а не уложены в виде α -спирали; толщина мембраны в месте проникновения этих сегментов может быть менее 3 нм; соседние с этим сегментом части G-белка, включая по крайней мере одну основную аминокислоту (K или R), могут тоже заходить в мембрану.
- В. Минимальная длина трансмембранного сегмента, необходимая для правильной сортировки G-белка, составляет 13–14 аминокислотных остатков, так как G-белки с сегментом из 14 аминокислотных остатков направляются к плазматической мембране подобно нормальным G-белкам, а G-белки с сегментами из 12 аминокислотных остатков нет (табл. 8-4). Любопытно, что более короткие трансмембранные сегменты хорошо закрепляют этот белок в мембране, но влияют на сортировку. Можно назвать две из возможных причин этого явления: 1) изменяется характер свертывания домена, обращенного в цитоплазму, или домена, обращенного в просвет, из-за чего исчезает необходимый для сортировки сигнал; 2) измененное расположение аминокислотных остатков в самом сегменте, пронизывающем мембрану, или рядом с ним служит причиной того, что белок связывается с постоянными компонентами ЭР или *cis*-компартамента аппарата Гольджи.

Литература: Adams, G. A., Rose, J. K. Structural requirements of a membrane-spanning domain for protein anchoring and cell surface transport. *Cell* 41:1007–1015, 1985.

Транспорт белков из аппарата Гольджи в лизосомы

8-35

- А. лизосома
- Б. кислые гидролазы
- В. эндолизосома (эндолизосомный компартмент)
- Г. аутофагия; аутофагосома
- Д. фагосомы; фаголизосомы
- Е. I-клеточная болезнь

8-36

- А. Неправильно. Протонная помпа в лизосомных мембранах накапливает протоны в лизосомы, чтобы в них поддерживался низкий pH.
- Б. Правильно.
- В. Правильно.
- Г. Неправильно. Материал, поглощенный путем эндоцитоза, проходит путь от окаймленных ямок к эндосомам и лишь затем к лизосомам.
- Д. Правильно.
- Е. Неправильно. Добавление слабого основания приводит к накоплению рецепторов M6Ф в эндолизосомах. Рецепторы M6Ф, ко-

которые хорошо связываются с лизосомными ферментами при нейтральном pH, обычно отделяются от них при более низком pH внутри эндолизосомы, а затем вновь поступают в аппарат Гольджи. Когда pH в эндолизосоме повышается, рецепторы М6Ф не могут отделиться от ферментов, следовательно, они не могут возобновить цикл и удерживаются в эндолизосоме.

Ж. Правильно.

З. Правильно.

И. Правильно.

8-37

- А. Факторами коррекции выступают сами лизосомные ферменты. Фермент, отсутствующий при синдроме Гюнтера, поставляется клетками Хёрлера, и наоборот, фермент, которого нет при синдроме Хёрлера, поставляется клетками Гюнтера. Эти ферменты присутствуют в среде по причине какого-то дефекта в сортировке, из-за которого они в основном не попадают в лизосомы, а выделяются из клеток, хотя несут маркер узнавания — маннозо-6-фосфат. Они избирательно поглощаются клетками и доставляются в лизосомы благодаря небольшому числу рецепторов маннозо-6-фосфата на поверхности клетки. Ферменты деградации, связавшиеся с рецепторами, поглощаются через окаймленные ямки, попадают в эндосомы и в конце концов оказываются в лизосомах. Последние являются именно тем участком, где в норме должны действовать ферменты деградации, поэтому природный дефект таким образом исправляется.
- Б. Обработка протеазой приводит к разрушению лизосомных ферментов. При обработке периодатом или щелочной фосфатазой удаляется маркер узнавания, маннозо-6-фосфат, необходимый для связывания с рецептором, в результате чего ферменты не могут поглощаться клетками (активность их при этом сохраняется).
- В. Такая схема опыта, по-видимому, не подходит для изучения дефектов в ферментах цитозоля. Внеклеточные белки обычно не проходят сквозь мембраны; таким образом, даже когда они попадают в клетку, они остаются в полости компартмента, ограниченного мембраной. К тому же чужеродные белки обычно попадают в лизосомы и разрушаются.

Литература: Kaplan, A., Achord, D. T., Sly, W. S. Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:2026–2030, 1977.

8-38 Результаты опытов с предполагаемыми мутантными I-клетками указывают на то, что клетки мутанта А имеют дефект в рецепторе маннозо-6-фосфата; клетки мутанта В имеют дефект в N-ацетилглюкозаминфосфат-трансферазе, а клетки мутанта С дефектны по фосфогликозидазе, которая отщепляет N-ацетилглюкозамин. Эти дефекты можно выявить при анализе экспериментальных наблюдений, описанном ниже.

Клетки мутанта А были неспособны поглощать лизосомные ферменты из культуральной среды клеток дикого типа, что свидетельствует о дефекте в их рецепторе для маннозо-6-фосфата. У них нет дефекта по маркеру, маннозо-6-фосфату, судя по тому, что секретируемые ими лизосомные ферменты исправляли такой дефект у клеток Хёрлера.

Клетки мутанта В поглощали лизосомные ферменты из культуральной среды клеток дикого типа, что указывает на наличие у них функционального рецептора маннозо-6-фосфата. Секрети-

руемые ими ферменты не исправляли дефект у клеток Хёрлера, следовательно, они не были должным образом модифицированы. Неподходящая в данном случае модификация не исправлялась обработкой ферментом, который отщепляет N-ацетилглюкозамин, а это предполагает (по принципу исключения), что дефект заключается в N-ацетилглюкозаминфосфат-трансферазе.

Клетки мутанта С были способны поглощать лизосомные ферменты из культуральной среды клеток дикого типа, что указывает на наличие у них функционального рецептора маннозо-6-фосфата. Судя по тому, что секретируемые ими ферменты не исправляли дефект клеток Хёрлера, они не были модифицированы должным образом; однако эта модификация исправлялась при обработке ферментом, отщепляющим N-ацетилглюкозамин. Следовательно, данные клетки дефектны по указанному ферменту.

Транспорт из аппарата Гольджи в секреторные везикулы и к поверхности клетки

8-39

- А. конститутивный; регулируемая (запускаемая)
- Б. секреторные везикулы (секреторные гранулы)
- В. апикальная; базолатеральная
- Г. капсид; белки оболочки

8-40

- А. Неправильно. Секреторные везикулы отпочковываются от *транс*-сети аппарата Гольджи.
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. Специальные сортирующие сигналы нужны для белков, направляемых в лизосомы и в секреторные везикулы, а поток материала к плазматической мембране может идти и по неизбирательному, «валовому» пути, для которого не нужен сортирующий сигнал.
- Г. Неправильно. Апикальные и базолатеральные белки могут иметь разные сортирующие сигналы, направляющие их к определенным областям мембраны, но может быть и так, что лишь один путь требует сортирующего сигнала, а другой реализуется и без такого механизма.
- Д. Правильно.
- Е. Правильно.

8-41 Медленная стадия конститутивной секреции трансферрина осуществляется в ЭР. Медленная стадия конститутивной секреции альбумина протекает в аппарате Гольджи. Из рис. 8-20 ясно видно, что большая часть трансферрина в клетке находится в ЭР, а большая часть альбумина – в аппарате Гольджи. Характер стационарного распределения белков при конститутивной секреции указывает на то, что разные белки большую часть своего времени жизни находятся в клетке в разных компартментах. Как и в любой последовательности реакций накопление белка происходит на медленном этапе процесса. Следовательно, по локализации большей части материала можно определить местоположение этого этапа.

Конститутивная секреция трансферрина идет медленнее, чем секреция альбумина, потому что первый задерживается в ЭР. Этот результат, по-видимому, отражает общий принцип: если консти-

тутивная секреция какого-либо белка идет медленно, то этот белок по какой-то причине задерживается в ЭР.

Литература: *Lodish, H. F., Kong, N., Snider, M., Strous, G. J. A. M.* Hepatoma secretory proteins migrate from rough endoplasmic reticulum to Golgi at characteristic rates. *Nature* 304:80–83, 1983.

Fries, E., Gustafsson, L., Peterson, P. A. Four secretory proteins synthesized by hepatocytes are transported from the endoplasmic reticulum to Golgi complex at different rates. *EMBO J.* 3:147–152, 1984.

8-42

- А. Если бы механизм сортировки в поляризованных клетках включал путь с использованием сигнала для одной области плазматической мембраны, и движение по остаточному принципу для другого участка, то чужеродный белок должен был бы идти по тому или другому пути. Поскольку чужеродные белки, по-видимому, не содержат сигнала для специфической сортировки, они, вероятнее всего, должны следовать по второму, неспецифическому пути.
- Б. Высвобождение секретируемых белков в равных количествах из апикальной и из базолатеральной частей поляризованных клеток не согласуется с упрощенным представлением о предполагаемом механизме сортировки. Таким образом, гипотеза раздельного существования рецепторного и неспецифического путей в настоящем ее виде, судя по всему, не верна. Как следует из этих экспериментов, каким бы ни был механизм, по которому чужеродные белки переносятся через мембрану, он никак не связан с тем, через какую часть клеточной поверхности происходит их перенос.

Литература: *Kondor-Koch, C., Bravo, R., Fuller, S. D., Cutler, D., Garoff, H.* Protein secretion in the polarized epithelial cell line MDCK. *Cell* 43:297–306, 1985.

Gottlieb, T. A., Beaudry, G., Rizzolo, L., Colman, A., Rindler, M. J., Adesnik, M., Sabatini, D. D. Secretion of endogenous and exogenous proteins from polarized MDCK monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2100–2104, 1986.

Везикулярный транспорт и сохранение индивидуальности компартментов

8-43

- А. клатрин
- Б. не покрытые клатрином

8-44

- А. Правильно.
- Б. Правильно.

8-45

Ваши эксперименты показывают, что везикулы, не покрытые клатрином, переносят G-белок, не концентрируя его. Концентрация G-белка во внутреннем пространстве цистерн на самом деле даже несколько выше, чем в зрелых и отпочковывающихся везикулах, как показали измерения, проведенные двумя различными методами. Если бы везикулы транспортировали G-белок по селективному пути (подобно везикулам, покрытым клатрином), то концентрация G-белка в них была бы существенно выше, чем в цистернах аппарата Гольджи.

Литература: *Orci, L., Glick, B. S., Rothman, J. E.* A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell* 46:171–184, 1986.

ДНК и белки, входящие в состав хромосом

9-1

- А. хромосома; геном
- Б. точка начала репликации; центромера; теломеры
- В. ген
- Г. экзоны; интроны
- Д. белки-регуляторы
- Е. метод торможения в геле
- Ж. «цинковые пальцы»
- З. спираль – виток – спираль
- И. кооперативное
- К. В-форма; А-форма; Z-форма
- Л. нуклеосомы
- М. гистоны; негистоновые хромосомные белки; хроматин
- Н. нуклеосомные; H1
- О. сверхчувствительные к нуклеазе сайты
- П. хроматин диаметром 30 нм

9-2

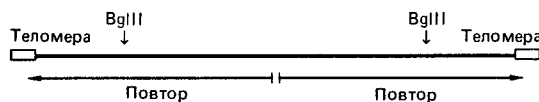
- А. Правильно.
- Б. Неправильно. Хромосомы не реплицируются с абсолютной точностью – при каждой репликации утрачиваются концевые нуклеотиды. Теломеры необходима для того, чтобы при каждой репликации потери нуклеотидов происходили только в области самой теломеры. Специальный фермент периодически надстраивает простую повторяющуюся последовательность, которая образует теломеру, и таким образом *компенсирует* неизбежную потерю нуклеотидов при репликации линейной хромосомы.
- В. Правильно.
- Г. Неправильно. По размерам интроны действительно обычно превосходят экзоны, но по количеству экзонов на один больше в каждом гене.
- Д. Правильно.
- Е. Правильно.
- Ж. Правильно.
- З. Неправильно. Хотя для хорошо изученных ДНК-связывающих белков это и справедливо, однако представляется маловероятным, чтобы каждая из этих полезных структур встречалась только у бактерий или только у эукариот. Существование гомологичных аминокислотных последовательностей позволяет предполагать, что структура спираль – виток – спираль имеется и в некоторых эукариотических ДНК-связывающих белках.
- И. Правильно.

- К. Неправильно. Если два белка связываются с частично перекрывающимися последовательностями ДНК, связывание одного из них будет препятствовать связыванию другого. Поскольку связывание одного белка исключает связывание другого, то их связывание будет не кооперативным, а конкурентным.
- Л. Правильно.
- М. Неправильно. Особые последовательности дают возможность ДНК скручиваться в спираль, когда нет взаимодействия с белками. Внутри клеток же большинство последовательностей ДНК скручиваются в тугую спираль за счет связывания с белками типа гистонов, как это происходит, например, при образовании нуклеосом.
- Н. Правильно.
- О. Правильно.
- П. Правильно.
- Р. Неправильно. В коротких линкерных участках ДНК между нуклеосомами не обнаружено сайтов, сверхчувствительных к нуклеазе. Такие сайты чаще встречаются в длинных последовательностях ДНК, лишенных нуклеосом.
- С. Правильно.
- Т. Неправильно. На электронных фотомикрографиях расправленного хроматина обычно наблюдаются регулярно расположенные нуклеосомные «бусины», присутствующие как в транскрибируемых, так и в нетранскрибируемых областях.

9-3 Сумма величин рестрикционных фрагментов не равна 21 т.п.н., и электрофоретическая картина меняется в зависимости от денатурации и ренатурации потому, что рибосомная мини-хромосома представляет собой инвертированный димер, или палиндром (рис. 9-32). Это означает, что последовательности, расположенные в левой половине мини-хромосомы, повторяются в противоположной ориентации в ее правой половине. Таким образом, рестриктаза разрезает каждое плечо (т.е. повторяющийся сегмент) в сайтах, равно удаленных от концов, при этом получают один центральный фрагмент и две одинаковые копии концевых фрагмента. В случае обработки BglII центральный фрагмент содержит 13,4 т.п.н., а два концевых фрагмента – по 3,8 т.п.н. Сумма длин рестрикционных фрагментов не равна 21 т.п.н., поскольку концевые фрагменты надо считать дважды: 2 фрагмента по 3,8 т.п.н. плюс 13,4 т.п.н. равно 21 т.п.н.

Денатурация и ренатурация мини-хромосомы или продуктов ее расщепления рестриктазами вызывают изменение электрофоретической картины, поскольку левая и правая половины одноцепочечных молекул, образовавшихся из центрального фрагмента, комплементарны и, следовательно, могут гибридизоваться сами на себя. Благодаря тому что две комплементарные половины входят в состав одной и той же молекулы, они гибридизуются друг с другом намного быстрее, чем с другими молекулами. Гибридизация «сама на себя» приводит к тому, что наблюдаемый размер молекулы уменьшается в 2 раза. Таким образом, не разрезанная рестриктазой хромосома после денатурации и ренатурации уменьшается в размере с 21 до 10,5 т.п.н. Аналогичным

Рис. 9-32. Палиндромная структура рибосомной мини-хромосомы из *Tetrahymena* (ответ 9-3).



образом центральный рестрикт BglII размером 13,4 т. п. н. уменьшается до 6,7 т. п. н. Одноцепочечные участки концевых фрагментов некомплементарны друг другу и, естественно, могут ренатурировать лишь с другими комплементарными им цепями, восстанавливая при этом свою обычную двухцепочечную структуру. Наиболее неожиданными выглядят данные о том, что рибосомные гены *Tetrahymena* входят в состав хромосомы микронуклеуса в виде одной половины инвертированного повтора, образующего мини-хромосому в макронуклеусе. Следовательно, когда после конъюгации из микронуклеуса образуется новый макронуклеус, рибосомные гены должны выщепиться из хромосомы таким образом, чтобы образовался именно инвертированный димер. Постарайтесь представить себе, как это происходит, а потом познакомьтесь с точкой зрения авторов одной из работ на эту тему (Yao, M.-C.; Zhu, S.-G.; Yao, C.-H. Mol. Cell. Biol. 5, 1260, 1985).

Литература: Karrer, K. M.; Gall, J. G. The macronuclear ribosomal DNA of *Tetrahymena pyriformis* is a palindrome. J. Mol. Biol. 104, 421–453, 1976.

9-4

- А. Рестрикционный анализ плазмиды показывает, что она представляет собой линейную молекулу. Если бы молекула была кольцевой, то после обработки рестриктазами, расщепляющими плазмиду в единственном сайте, должна была получаться одна полоса, соответствующая длине 12 т. п. н. в каждом случае, чего на самом деле не наблюдается. С другой стороны, после разрезания линейной молекулы в одном месте должны получиться две полосы, дающие в сумме 12 т. п. н. В результате обработки каждой из трех рестриктаз, разрезающих молекулу в одном участке, получались две полосы, дающие в сумме 12 т. п. н., следовательно, плаزمида должна быть линейной молекулой.
- Б. Расщепление под действием BamHI или BglII приводит к образованию фрагментов ДНК, содержащих идентичные последовательности (GATC) на 5'-концах. Следовательно, эти фрагменты могут соединяться во всех возможных сочетаниях. Гибридные участки, образовавшиеся в результате соединения BamHI-конца и BglII-конца (AGATCC и GGATCT), не могут быть разрезаны ни одним из ферментов. Напротив, участки, образовавшиеся при соединении двух BamHI-концов или двух BglII-концов, могут быть разрезаны и тем, и другим ферментом. Следовательно, если присутствуют ДНК-лигаза, BamHI и BglII, то гомологичные участки, образующие сайт для расщепления BamHI или сайт для расщепления BglII, снова быстро разрезаются, тогда как гибридные участки, которые не могут быть разрезаны, накапливаются. Таков способ селективного получения гибридных соединений.

Литература: Szostak, J. W.; Blackburn, E. H. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. Cell 29, 245–255, 1982.

9-5

- А. Число повторов в концевом фрагменте должно существенно варьировать. На это указывает широкая полоса, получающаяся при расщеплении рестриктазой AluI вблизи конца мини-хромосомы (наблюдение б). Если бы число повторов в каждой молекуле было одинаковым, то полоса, содержащая концевой фрагмент, оказалась бы узкой и интенсивной, а не широкой. Отрезок между ведущим и запаздывающим краями этой полосы составляет около 160 п. н., что соответствует примерно 27 повторам. Это и есть масштаб варьирования числа повторов в теломере.

Гораздо труднее определить по этим данным среднее число повторов на теломере, так как остается неизвестным расположение сайта узнавания AluI относительно начала повторов. Однако если расщепление AluI происходит точно в начале повторов, то число повторов должно в таком случае варьировать от 60(360/6) до 87(520/6). Полагают, что на одну теломеру приходится около 70 повторов.

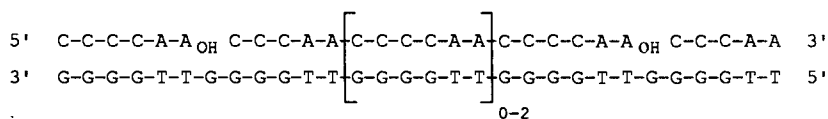
- Б. Повторы ССССAA расположены на 5'-концах отдельных цепей мини-хромосомы. Поскольку синтез ДНК, начинающийся в тандемно повторенной последовательности, постепенно распространяется к центру мини-хромосомы (наблюдение 7), то повторы должны находиться на 5'-концах. Если бы повторы располагались на 3'-концах, то синтез ДНК происходил бы по направлению к концам мини-хромосомы.
- В. Одноцепочечные интервалы в повторах ССССAA по большей части представляют собой пропуск одного нуклеотида. Поскольку при денатурации высвобождаются одноцепочечные фрагменты (наблюдение 4), то должны быть разрывы в фосфодиэфирном скелете. Вероятно, эти разрывы содержат 3'-ОН, поскольку они служат сайтами для синтеза ДНК (наблюдения 1, 3 и 7), однако они не могут быть простыми разрывами 5'-РО₄ с 3'-ОН, так как обработка мини-хромосомы лигазой не приводит к снижению включения нуклеотидов ДНК-полимеразой (наблюдение 2). Природу этих одноцепочечных разрывов можно выявить, если произвести замещение свободных 5'-фосфатов мечеными фосфатами и затем разрушить все связи с пуриновыми нуклеотидами, что приведет к образованию преимущественно фрагмента ССС (наблюдение 5). Этот результат указывает на то, что большинство разрывов представляют собой пропуски одного нуклеотида, а именно первого С(5'-С)-повтора. (Если бы был пропущен 3'-С в последовательности —ССС—АА—, то метка по 5'-фосфату присоединялась бы к А, а фрагмент ССС оказался бы немеченым.) Длина разрыва скорее всего не больше размера одного нуклеотида, так как ДНК-полимераза может включать меченый С в отсутствие других нуклеотидов (наблюдение 1). (Если бы разрыв соответствовал, например, двум нуклеотидам, то первым нуклеотидом, встроенным ДНК-полимеразой, был бы А.)
- Г. В связи с тем что при денатурации теломеры образуются одноцепочечные фрагменты, соответствующие 2, 3 и 4 повторам ССССAA (наблюдение 4), одноцепочечный разрыв может в среднем встречаться один раз на каждые два-четыре повтора.
- Д. Эти результаты показывают, что строение теломеры в рибосомной мини-хромосоме соответствует показанному на рис. 9-33. В этой модели учтены все экспериментальные данные.

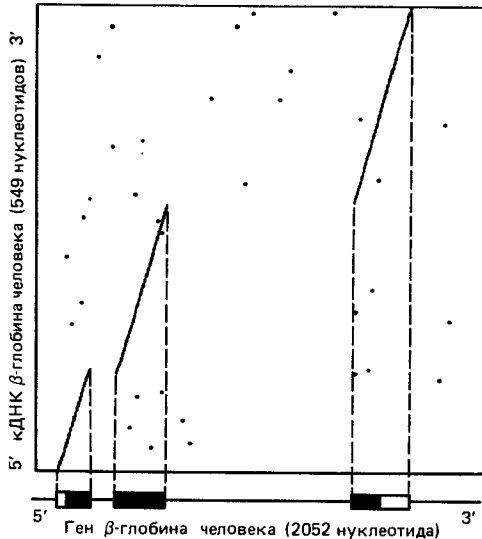
Литература: Blackburn, E. H.; Gall, J. G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. J. Mol. Biol. 120, 33–53, 1978.

9-6

- А. Экзоны в гене β-глобина человека соответствуют положениям, где наблюдается гомология с кДНК; последняя представляет собой

Рис. 9-33. Часть концевого повтора рибосомной мини-хромосомы. Указано положение специфических пропусков одного нуклеотида (ответ 9-5).



А. ЭКЗОНЫ В ГЕНЕ β -ГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА

Б. ГОМОЛОГИЯ ГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ

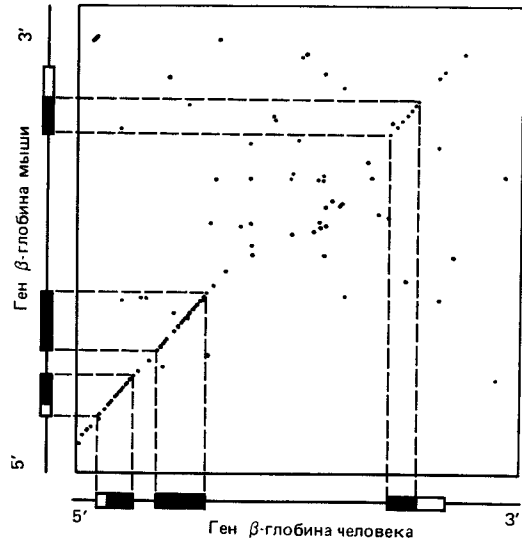


Рис. 9-34. Точечные матрицы, показывающие расположение экзонов в гене β -глобина человека (А) и соотношение между гомологичными последовательностями мыши и экзонами гена человека (Б) (ответ 9-6). Экзоны представлены в виде прямоугольников, светлая часть которых соответствует некодирующим последовательностям на 5'-и 3'-концах.

непосредственно копию мРНК и, следовательно, не содержит интронов. Интроны соответствуют областям, расположенным между экзонами. Положения интронов и экзонов в гене β -глобина человека показаны на рис. 9-34, А.

Б. Судя по положениям экзонов, указанным на рис. 9-34, А, первые два экзона в гене β -глобина человека гомологичны соответствующим последовательностям в гене β -глобина мыши (рис. 9-34, Б). Однако в третьем экзоне лишь первая половина его гомологична последовательностям гена β -глобина мыши. В гомологичной части третьего экзона содержатся последовательности, кодирующие белок, тогда как негомологичная часть представляет собой нетранслируемую 3'-область гена. Поскольку эта часть гена не кодирует белок (а также не содержит протяженные области регуляторных последовательностей), она эволюционирует примерно с той же скоростью, что и интроны.

В. 5'-области генов β -глобина человека и мыши также гомологичны, что видно по скоплению точек вокруг той же диагонали, на которую приходится скопление точек для первого экзона (рис. 9-34, Б). Эти области соответствуют регуляторным областям, расположенным перед точками начала транскрипции генов. В связи с тем что данная область несет регуляторные функции, возможности ее изменений в ходе эволюции ограничены, подобно тому как они ограничены по причине кодирующей функции в случае экзонов. Функциональные последовательности, испытывающие давление отбора, дивергируют значительно медленнее, чем последовательности, не имеющие определенных функций.

Г. Исходя из точечной матрицы, представленной на рис. 9-5, Б, можно заключить, что первые интроны имеют примерно одну и ту же длину в генах мыши и человека, однако вторые интроны у них значительно различаются по длине. Если бы эти интроны имели одинаковую длину, то линейные сегменты, представляющие собой гомологичные области, лежали бы на одной и той же диагонали. Самый простой способ выявить подобную коллинеарность - это наклонить страницу и посмотреть вдоль диагонали. На основе представленного сравнения невозможно определить, с чем связано

изменение длины: с укорочением интрона у мыши или же с удлинением интрона у человека.

Литература: Konkel, D. A.; Maizel, J. V.; Leder, P. The evolution and sequence comparison of two recently diverged mouse chromosomal β -globin genes. Cell 18, 865-873, 1979.

Staden, R. An interactive graphics program for comparing and aligning nucleic acid and amino acid sequences. Nucleic Acids Res. 10, 2951-2961, 1982.

9-7

- А. В том случае, когда относительная подвижность минимальна, участки связывания CAP отстоят друг от друга на расстояние 85 нуклеотидов (рис. 9-6, В). Если на один виток приходится 10,6 нуклеотида, то данное расстояние соответствует 8 виткам спирали ($85/10,6 = 8$). В случае максимальной относительной подвижности CAP-связывающие участки отстоят друг от друга на расстояние 79 нуклеотидов, что соответствует 7,5 виткам спирали.
- Б. Два CAP-связывающих участка должны быть изогнуты совершенно одинаково, так как они идентичны. Следовательно, в обоих этих участках в центре изгиба должна оказаться одна и та же бороздка, обращенная вовнутрь. Чтобы ДНК изогнулась с образованием *цис*-конфигурации, два центра связывания должны быть на одной и той же стороне спирали. Большие бороздки (или малые бороздки) располагаются на одной и той же стороне спирали, если в промежутке между центрами изгибов укладывается целое число ее витков. Таким образом, можно ожидать, что минимум относительной подвижности (*цис*-конфигурация) будет соответствовать тому, что расстояние между центрами изгибов равно целому числу витков спирали. Аналогичным образом максимальная относительная подвижность (*транс*-конфигурация) будет достигнута, когда центры изгиба находятся на противоположных сторонах спирали, т.е. когда количество витков между центрами изгибов равно половине целого числа.
- В. В случае минимальной подвижности конструкции с одним участком связывания CAP и одним участком связывания $(A_5N_5)_4$, центры изгибов разделены 101 нуклеотидом (рис. 9-6, Г). Если на один виток спирали приходится 10,6 нуклеотида, то центры изгибов разделяет 9,5 витка ($101/10,6 = 9,5$).
- Г. Поскольку минимальная подвижность определяется тем, что число витков между центрами изгибов равно половине целого числа (*цис*-конфигурация), одна и та же бороздка спирали не может оказаться обращенной внутрь в центрах обоих изгибов. В противном случае, как уже обсуждалось в пункте Б, центры изгиба при *цис*-конфигурации были бы разделены целым числом витков. Таким образом, в центрах двух изгибов внутрь должны быть обращены разные бороздки. Поскольку известно, что в сайте $(A_5N_5)_4$ внутри изгиба проходит большая бороздка, (как было сказано в задаче), то участок связывания CAP должен быть изогнут так, чтобы в центре изгиба внутрь него была обращена малая бороздка.

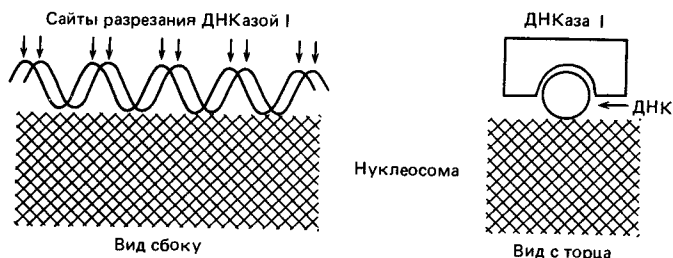
Литература: Zinkel, S. S.; Crothers, D. M. DNA bend direction by phase sensitive detection. Nature 328, 178-181, 1987.

Gartenberg, M. R.; Crothers, D. M. DNA sequence determinants of CAP-induced bending and protein binding affinity. Nature 333, 824-829, 1988.

9-8

- А. Микрококковая нуклеаза может разрезать лишь ту ДНК, которая не связана с нуклеосомами. Таким образом, ее мишенью служит

Рис. 9-35. Схематическое изображение ДНК, связанной с поверхностью нуклеосомы, и вызванного этим взаимодействием стерического препятствия для воздействия ДНКазы I (ответ 9-8). Стрелками указано положение фосфодиэфирных связей, наиболее доступных для действия ДНКазы I.



линкерная ДНК, расположенная между нуклеосомами. Чтобы обработка микрококковой нуклеазой могла привести к образованию лесенки полос, нуклеосомы должны равномерно располагаться вдоль ДНК, т.е. отрезки линкерной ДНК между нуклеосомами должны быть примерно одинаковой длины. Действительно, лесенка с интервалом, соответствующим разнице в 200 нуклеотидов, свидетельствует о том, что длина линкерной ДНК вместе с длиной нуклеосомной ДНК составляет 200 нуклеотидов.

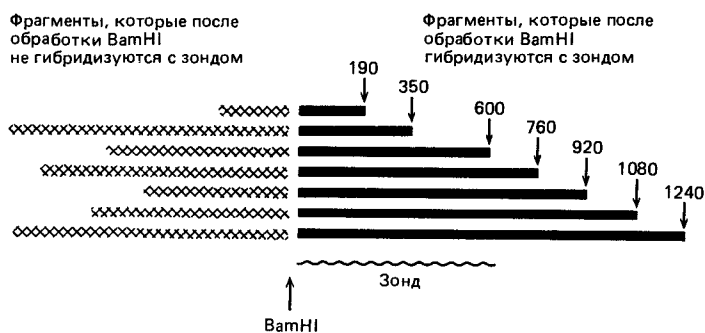
Б. Если продлить время обработки ядер нуклеазой так, чтобы разрушились большие участки ДНК, то практически каждый линкерный участок будет надрезан, а вся линкерная ДНК расщеплена на небольшие фрагменты. Оставшаяся ДНК (т.е. входящая в состав нуклеосом) должна будет дойти до самого конца геля. На самом деле когда ставят такой эксперимент, то ДНК располагается в зоне, соответствующей длине фрагментов примерно в 140 нуклеотидов. Именно такой размер имеет структура ДНК, уложенной витками вокруг гистоновой коры и образующей нуклеосому. Этот результат свидетельствует о том, что длина линкерной ДНК в хроматине из печени крысы составляет примерно 60 нуклеотидов.

В. Как показано на рис. 9-35, если ДНК связана с какой-либо поверхностью, то наиболее доступными фосфодиэфирными связями будут те, что дальше всего отстоят от этой поверхности. В соответствии с особенностями геометрической структуры сайта связывания ДНКазы I лишь верхняя часть спирали будет доступна для расщепления. Возникающая при электрофорезе лесенка полос имеет интервал, соответствующий разности длин фрагментов, равной 10 нуклеотидам, потому что примерно столько нуклеотидов приходится на один виток спирали. Следовательно, доступные фосфатные связи будут располагаться с интервалами примерно в 10 нуклеотидов.

Литература: *Prunell, A.; Kornberg, R.D.; Lutter, L.; Klug, A.; Levitt, M., Crick, F.H. Periodicity of deoxyribonuclease I digestion of chromatin. Science 204, 855-858, 1979.*

9-9 Присутствие фракции, устойчивой к нуклеазе, в хроматине, но не в чистой ДНК дает возможность предположить, что у марсианского микроорганизма ДНК входит в состав структур, подобных нуклеосомам, которые и защищают ее от микрококковой нуклеазы. Поскольку при жесткой обработке самый мелкий фрагмент состоит примерно из 300 нуклеотидов, то структура, подобная нуклеосоме, должна защищать фрагмент ДНК примерно такой длины. Образование шлейфа при разделении продуктов расщепления свидетельствует о том, что структуры, подобные нуклеосомам, у марсианского микроорганизма не расположены, как у земных организмов, на одинаковом расстоянии друг от друга. Если бы в марсианских клетках нуклеосомы располагались

Рис. 9-36. Схема, иллюстрирующая применение метода непрямого мечення концов для анализа фрагментов разной длины, представленных на рис. 9-9, (ответ 9-10). Участки расщепления микрококковой нуклеазой указаны стрелками, направленными вниз. Небольшой разрыв посередине фрагментов, образовавшихся при обработке нуклеазой, представляет собой участок расщепления ферментом *Bam*HI. Числа означают длину фрагментов, гибридирующихся с зондом, и соответствуют длинам фрагментов, представленных на рис. 9-9.

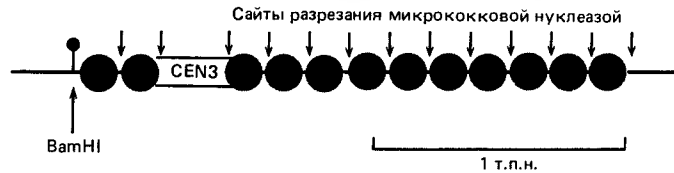


на одинаковом расстоянии друг от друга, то образовалась бы лесенка полос, аналогичная той, что наблюдается при анализе хроматина из печени крысы.

9-10

- А.** При обработке микрококковой нуклеазой образуются фрагменты, длина которых варьирует в зависимости от протяженности участка между нуклеосомами (ею определяются концы фрагментов) (рис. 9-36). Поскольку микрококковая нуклеаза разрезает ДНК не в строго определенных участках внутри линкерной ДНК, то имеется некоторый разброс в длине фрагментов даже при расщеплении между двумя одинаковыми парами нуклеосом. Вместе с тем, при расщеплении нескольких разных пар межу нуклеосомных участков могут образоваться фрагменты одинакового размера. Подобная вариабельность мешает точно определить порядок расположения соседних нуклеосом. После обработки *Bam*HI полосы получают более четкими потому, что в этом случае один конец каждого фрагмента ДНК точно фиксирован. Как показано на рис. 9-36, лишь фрагменты, лежащие вправо от участка расщепления ферментом *Bam*HI, гибридируются с радиоактивным зондом. Полученные результаты легко интерпретировать, поскольку длина каждого фрагмента прямо соответствует расстоянию между участком расщепления нуклеазой и участком разрезания *Bam*HI. В варианте без обработки *Bam*HI оба конца фрагментов определяются участками расщепления микрококковой нуклеазой. В этом случае нельзя точно определить положение сайта разрезания по отношению к зонду, поскольку при расщеплении нуклеазой нескольких пар участков могут образоваться фрагменты одного размера. Описанный в этой задаче метод картирования концов, образующихся при обработке нуклеазой, называется методом непрямого мечення концов, потому что определенный конец (участок расщепления *Bam*HI) метится косвенным образом путем гибридизации с радиоактивно меченным зондом.
- Б.** Размеры фрагментов указывают на расстояние между участками расщепления нуклеазой и участком расщепления *Bam*HI (рис. 9-36). Поскольку микрококковая нуклеаза разрезает ДНК между нуклеосомами, то участки расщепления позволяют определить расположение нуклеосом относительно участка расщепления *Bam*HI (рис. 9-37). За исключением области вокруг центромеры, сайты разрезания расположены с интервалом в 160 нуклеотидов. Это дает возможность предположить, что нуклеосомы закрывают около 160 нуклеотидов ДНК. Однако участки расщепления по сторонам центромеры отстоят друг от друга на расстояние 250 нуклеотидов; следовательно, центромеру закрывает какая-то особая структура (не нуклеосома). Полагают, что специальные белки связываются

Рис. 9-37. Расположение сайтов расщепления микрококковой нуклеазой вокруг центromеры (ответ 9-10). Нуклеосомы обозначены кружками.



с центромой и защищают ее от действия нуклеазы. Участки расщепления по сторонам от центromеры показывают, что между центромой и соседними нуклеосомами находится незащищенная ДНК (аналогичная линкерной ДНК между нуклеосомами).

- В. Контрольный опыт с очищенной ДНК нужен потому, что не все последовательности ДНК одинаково чувствительны к микрококковой нуклеазе. Важно знать чувствительность каждой изучаемой последовательности ДНК. Иначе можно ошибочно полагать, что появление специфической полосы объясняется связыванием белка рядом с участком расщепления, в то время как на самом деле она зависит от специфичности расщепления нуклеазой. В действительности центromера сама по себе – предпочтительный участок разрезания (хотя это не показывают результаты по обработке нуклеазой очищенной ДНК, представленные на рис. 9-9). Тот факт, что в этом чувствительном участке расщепления не происходит, служит еще одним доказательством специфической защищенности этой последовательности.
- Г. Ваши результаты позволяют очень элегантным способом ответить на поставленный вопрос. Основной результат – это распределение полос для трех плазмид. Если порядок расположения нуклеосом определяется просто тем, что нуклеосомы выстраиваются за особой структурой, находящейся в области центromеры, тогда неважно, какая последовательность ДНК примыкает к центromере. Однако ваши результаты по плазмидам 2 и 3 явно свидетельствуют в пользу того, что упорядоченное расположение прерывается в том месте, где начинаются бактериальные последовательности (плазмида 2) либо не связанные с центромой дрожжевые последовательности (плазмида 3). Эти результаты четко показывают, что правильное расположение нуклеосом вокруг центromеры определяется неким свойством соседней с центромой последовательности ДНК.

Литература: Bloom, K. S.; Carbon, J. Yeast centromere DNA is a unique and highly ordered structure in chromosomes and small circular minichromosomes. *Cell* 29, 305–317, 1982.

Структура хромосомы

9-11

- А. петельные домены
- Б. хроматиды (хромосомы)
- В. кариотип
- Г. хромосомы типа ламповых щеток
- Д. политенные хромосомы
- Е. хромосомные пuffs
- Ж. активный
- З. гетерохроматин

9-12

- А. Правильно.

- Б. Правильно.
 В. Правильно.
 Г. Неправильно. Большая часть ДНК в хромосомах типа ламповых щеток находится в хромомерах, а не в петлях.
 Д. Неправильно. Политенные хромосомы образованы плотно прилегающими друг к другу нитями хроматина.
 Е. Правильно.
 Ж. Неправильно. Данные классической генетики дают возможность предположить, что каждый диск соответствует гену, однако проведенные недавно молекулярно-биологические исследования показали, что количество различных мРНК в три раза превышает число дисков. Поэтому гипотеза «один диск – один ген» скорее всего неверна.
 З. Правильно.
 И. Правильно.
 К. Неправильно. Транскрипционно неактивный хроматин – это действительно ДНК в конденсированной форме, относительно устойчивой к нуклеазе, однако всего около 10–20% его имеет сильно конденсированную конформацию, называемую гетерохроматином.

9-13 Равномерное включение метки, наблюдаемое в случае маленьких петель хроматина, не является неожиданным. На первый взгляд могло показаться, что если транскрипция движется от одного конца петли к другому, то и мечение тоже должно идти от одного конца к другому, как это происходит в случае больших петель (рис. 9-10). Однако если транскрипция происходит сразу по всей длине петли хроматина (осуществляется многими РНК-полимеразы), как это показано на рис. 9-11, то ^3H -уридин может включаться тоже по всей длине петли, поскольку каждая из полимераз добавляет к растущей цепи РНК уридин (рис. 9-38). С увеличением времени инкубации будет включаться все большее количество метки, и, таким образом, следует ожидать увеличения интенсивности мечения по всей петле.

Как же тогда объяснить данные по включению метки в случае больших петель? Ответ пока неизвестен. В связи с тем что большие петли метятся не раньше чем через день, полагают, что эти петли вообще не транскрибируются. Вместо этого они, возможно, служат сайтами накопления РНК, синтезированной в других местах, причем связывание такой РНК начинается на одном из концов петли.

Литература: Callan, H. G. The nature of lampbrush chromosomes. *Int. Rev. Cytol.* 15, 1–34, 1963.

Gall, J. G. Personal communication.

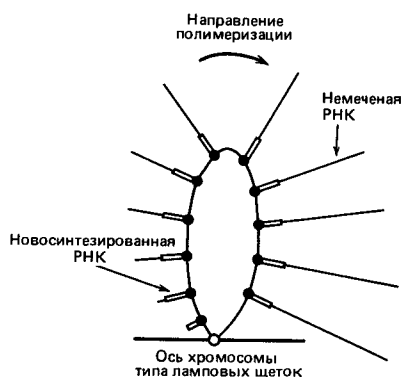


Рис. 9-38. Равномерное включение радиоактивного уридина при синтезе РНК на петле хроматина (ответ 9-13). Новосинтезированная РНК обозначена прямоугольниками, примыкающими к молекулам РНК-полимераз, которые обозначены черными кружками.

9-14 По всей длине анализируемого хромосомного фрагмента размером 315 т.п.н. относительный уровень репликации варьирует в пределах не более чем $\pm 50\%$. Подобная вариабельность относительно невелика, если принять во внимание, что политенные хромосомы амплифицированы почти 1000-кратно. Кроме того, из результатов не следует, что низкие значения приходятся на область междисков. Таким образом, данные говорят о том, что отличие дисков от междисков обусловлено разной упаковкой ДНК, а не репликацией.

Одинаковые полосы рестриктов в случаях диплоидной и политенной ДНК также подтверждают это заключение, но более тонким способом. Если бы была верна модель дифференциальной

репликации, то должны были образоваться рестрикты, различающиеся по размерам, в том числе такие, которые захватывали бы и репликативную вилку. Фрагменты, содержащие разветвление, обладали бы иной подвижностью, чем неразветвленные (см. задачу 9-19). В действительности подобной аномальной подвижности фрагментов не наблюдается.

Литература: Spierer, A.; Spierer, P. Similar levels of polyteny in bands and interbands of *Drosophila* giant chromosomes. *Nature* 307, 176-178, 1984.

9-15

- А. ДНКазы I предпочтительно расщепляют активный хроматин. Эритроциты экспрессируют глобин, и в результате обработки ядер эритроцитов ДНКазой I снижается способность ДНК защищать глобиновую кДНК. Следовательно, хроматин, с которого транскрибируется глобиновая РНК, предпочтительно расщепляется ДНКазой I. Напротив, фибробласты не экспрессируют глобин, и обработка ядер фибробластов ДНКазой I не влияет на способность их ДНК защищать глобиновую кДНК. Таким образом, глобиновые гены в фибробластах не более чувствительны, чем весь хроматин.
- Б. При обработке ядер эритроцитов ДНКазой I деградации подвергаются главным образом области активного хроматина. При сравнении степени защищенности ДНК эритроцитов, меченной ^3H , препаратами суммарной ДНК (95%) и ДНК, обработанной ДНКазой I (78%), оказалось, что около 17% (95-78) ДНК эритроцитов чувствительны к ДНКазе I и, согласно этому критерию, входят в состав активного хроматина.
- В. Обработка нуклеосом трипсином влияет на их особую популяцию, а именно на нуклеосомы из активного хроматина. Этот вывод сделан в результате сравнения нуклеосом, обработанных трипсином, с ДНК эритроцитов, обработанной ДНКазой I. При расщеплении микрококковой нуклеазой нуклеосом, обработанных трипсином, получается ДНК, которая защищает глобиновую кДНК и ДНК эритроцитов (25 и 83% соответственно) в той же степени, в какой это делает ДНК эритроцитов, обработанная ДНКазой I, (25 и 78% соответственно) (табл. 9-1).

(Если бы трипсин действовал на случайную популяцию нуклеосом, то все последовательности ДНК, присутствующие в необработанных нуклеосомах, обнаружались бы также в нуклеосомах, обработанных трипсином. В таком случае обработанные и необработанные нуклеосомы не различались бы по своей способности защищать глобиновую кДНК и ДНК эритроцитов.)

- Г. Поскольку ДНК в составе отдельных нуклеосом в такой же степени чувствительна к ДНКазе I, как и хроматин в ядре, то свойство активного хроматина, отличающее его от суммарного хроматина, должно проявляться на уровне отдельных нуклеосом. Эту точку зрения подтверждают данные о том, что обработка нуклеосом трипсином делает нуклеосомы из активного хроматина чувствительными к микрококковой нуклеазе. Отдельные нуклеосомы из областей активного хроматина должны физически отличаться от других нуклеосом.

Литература: Weintraub, H.; Groudine, M. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. *Science* 193, 848-856, 1976

Репликация хромосом

9-16

- А. S-фаза
- Б. репликативная (репликационная) вилка, точка начала репликации
- В. репликоны
- Г. Т-антиген
- Д. блокада повторной репликации

9-17

- А. Неправильно. В клетках эукариот репликативные вилки передвигаются примерно на порядок медленнее, чем в клетках бактерий. Более низкая скорость, возможно, объясняется тем, что ДНК, упакованную в хроматин, реплицировать труднее.
- Б. Правильно.
- В. Правильно.
- Г. Неправильно. В отличие от синтеза большинства белков, который происходит непрерывно на протяжении интерфазы, синтез гистонов осуществляется главным образом в S-фазе, когда уровень гистоновой мРНК повышается примерно в 50 раз в результате усиления транскрипции, а также снижения скорости деградации мРНК.
- Д. Правильно.
- Е. Правильно.
- Ж. Неправильно. Активная X-хромосома реплицируется на протяжении всей S-фазы, а инактивированная X-хромосома, которая полностью состоит из гетерохроматина, реплицируется на поздней стадии S-фазы.
- З. Правильно.
- И. Правильно.
- К. Неправильно. В таких экспериментах по слиянию клеток синтез ДНК стимулируется в ядрах, находящихся в фазе G_1 , а не в фазе G_2 . На стадии G_2 в точках начала репликации действует блокада повторного синтеза ДНК, возникающая во время S-фазы.

9-18

- А. Области треков с большим количеством гранул серебра соответствуют тем фрагментам ДНК, которые реплицировались при высокой концентрации метки. Области с меньшим содержанием гранул соответствуют тем участкам ДНК, которые реплицировались при сниженной концентрации метки.
- Б. Различие в расположении темных и светлых участков на треках возникает вследствие того, что в двух экспериментах мечение осуществлялось по-разному. В первом опыте (рис. 9-14, А) ^3H -тимидин вводили сразу же после прекращения блокады синтеза ДНК, применяемой для синхронизации. Следовательно, репликация в точках ее инициации начиналась в присутствии метки, что приводило к возникновению темных участков по обеим сторонам от точки начала репликации. При снижении концентрации метки репликация распространялась в обоих направлениях от точки начала репликации, образуя светлые участки на каждом конце темных участков. Во втором опыте (рис. 9-14, Б) репликация в точках ее инициации начиналась в отсутствие ^3H -тимидина, и, таким образом, точка начала репликации оставалась немеченой. Внесение большого количества метки и последующее снижение ее концентрации приводили к возникновению темного участка со светлым фрагментом на одном конце. Соседние темные области

фактически являются частями одной и той же реплицирующейся молекулы ДНК. Между ними лежат немеченые (а потому невидимые) сегменты, содержащие точки начала репликации.

- В. Скорость движения репликативной вилки можно приблизительно определить, исходя из времени мечения и длины помечившихся областей. В первом эксперименте участки длиной около 100 мкм метились за 45 мин. Поскольку в синтезе каждого меченого сегмента участвуют две репликативные вилки, то каждая из них за 45 мин синтезирует примерно 50 мкм ДНК. Таким образом, скорость движения репликативной вилки равна приблизительно 1,1 мкм/мин ($50:45 = 1,1$). Во втором опыте за это время помечились фрагменты размером около 50 мкм, однако каждый из этих участков был синтезирован лишь одной репликативной вилкой. Таким образом, скорость продвижения репликативной вилки здесь также равна примерно 1,1 мкм/мин ($50:45 = 1,1$).

Этих данных недостаточно, чтобы определить время, необходимое для репликации всего генома. Не хватает сведений о числе активных точек начала репликации и их распределении.

Литература: Huberman, J.A.; Riggs, A.D. On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosome. J. Mol. Biol. 32, 327-341, 1968.

9-19

- А. В области фрагмента длиной 4,5 т. п. н. гибридизация происходит с теми плазмидами, которые ко времени выделения ДНК еще не реплицировались. На то, что большинство плазмидных молекул еще не реплицировалось, указывает интенсивность этого пятна. Низкая частота реплицирующихся плазмидных молекул даже в S-фазе — это один из факторов, которые затрудняют доказательство того, что ARS представляет собой точку начала репликации.

- Б. Результаты, приведенные на рис. 9-16, показывают, что ARS1 служит точкой начала репликации. Распределение полос в геле при разделении ДНК, обработанной нуклеазой BglII, выглядит так, как если бы реплицирующиеся молекулы имели два разветвления (рис. 9-15, Б). Результаты, полученные для ДНК, обработанной PvuI, выглядят как зоны, образованные промежуточной репликативной формой, у которой репликационные глазки расположены асимметрично (рис. 9-15, Г). (Очень короткий «хвост» в пятне, соответствующем молекулам длиной 9 т. п. н. на рис. 9-16, Б, указывает на то, что репликационные глазки в реплицирующихся молекулах расположены немного асимметрично.) Именно такие зоны в геле ожидаются в случае, если репликация начинается с ARS1. Как показано на рис. 9-39, расщепление ферментом BglII, который разрезает последовательность в сайте ARS1, приводит к образованию молекул с двумя разветвлениями. Обработка PvuI, которая разрезает кольцевую молекулу примерно против сайта ARS1, приводит к образованию молекул с несколько асимметрично расположенными репликационными глазками.

- В. Разрыв в дугообразной зоне, содержащей продукты гибридизации с плазмидами, обработанными PvuI (рис. 9-16, Б), возникает вследствие того, что формы с разветвлением и формы с репликационным глазком различаются по подвижности. Молекулы, только что начавшие реплицироваться, при расщеплении PvuI образуют формы с глазком, а молекулы, в которых репликация уже прошла сайт PvuI, превращаются в форму с разветвлением. Таким образом, реплицировавшаяся молекула, разрезанная рестриктазой, несет либо глазок, либо разветвление, и никаких других промежу-

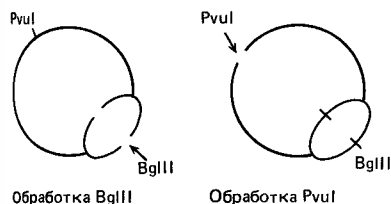


Рис. 9-39. Превращение реплицирующихся плазмидных молекул в линейные формы с двумя разветвлениями при обработке BglII или в линейные формы с несколько асимметрично расположенными репликационными глазками при обработке PvuI (ответ 9-19).

точных форм нет. Поскольку две формы различаются по подвижности, на электрофоретической картине виден разрыв.

Литература: Brewer, B.J.; Fangman, W.L. The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. Cell 51, 463-471, 1987.

9-20

- А. Кроме способности специфически связываться с определенным участком ДНК Т-антиген обладает еще АТР-зависимой геликазной активностью. Геликазная активность необходима для расплетания ДНК (см. МБК, гл. 5). Наличие Т-антигена в репликативных вилках также подтверждает то, что он обладает геликазной активностью.

Способность Т-антигена специфически связываться с точками начала репликации вируса SV40 и расплетать в них цепи ДНК реализуется на первой стадии репликации ДНК. Подобная активность приводит к экспонированию одноцепочечных областей, и праймазы и ДНК-полимеразы получают доступ к ДНК. При этом Т-антиген, вероятно, управляет связыванием одного или нескольких таких компонентов: антитела к Т-антигену осаждают комплекс ДНК-полимераза-праймаза, а Т-антиген способен стимулировать репликацию точек начала репликации SV40 лишь в определенных типах клеток. Все это дает возможность заключить, что инициация зависит от специфического взаимодействия Т-антигена с одним или несколькими компонентами механизма репликации, действующего в клетке.

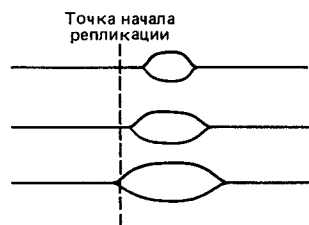
- Б. Для демонстрации того, что участки неспаренных оснований расположены в точке начала репликации, можно обработать ДНК рестриктазой, которая разрезает молекулу в строго определенном месте относительно точки начала репликации. (С помощью электронной микроскопии невозможно различить два конца линейной молекулы, поэтому, чтобы точно определить положение расплетенных областей, требуется обработка по крайней мере двумя разными рестриктазами.) Если в точке начала репликации расплетания не происходит, то расплетенные участки не захватят этот сайт (рис. 9-40, А). Если расплетение происходит в точке начала репликации, то расплетенный участок будет включать эту область. В случае когда расплетение распространяется в одном направлении, точка начала репликации совпадает с одним концом области расплетания (рис. 9-40, Б). Когда расплетение происходит в обоих направлениях (с одинаковой скоростью), центр расплетенной области совпадает с точкой начала репликации (рис. 9-40, В). Результаты данного эксперимента указывают на то, что расплетание происходит по обоим направлениям и примерно с одинаковой скоростью.

- В. Для расплетания замкнутых кольцевых молекул ДНК необходима топоизомераза I, которая устраняет избыточные витки цепи в дуплексной части молекулы. В ковалентно замкнутом кольце устранение закручивания дуплекса на одном участке приведет к тому, что остальная часть молекулы приобретает дополнительные витки, а это энергетически невыгодно. Кратковременное воздействие топоизомеразы I, образующей разрывы и зашивающей их, позволяет снять это напряжение закручивания.

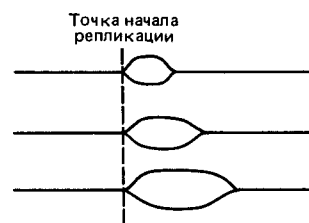
- Г. Если бы Т-антиген многократно инициировал репликацию с точки начала репликации SV40, встроенной в хромосому, то образовалась бы сложная многоцепочечная структура. Три цикла инициации в точке начала репликации показаны на рис. 9-41.

Очевидно, встроенная в хромосому точка начала репликации

А. РАСПЛЕТЕНИЕ НАЧИНАЕТСЯ НЕ В ТОЧКЕ НАЧАЛА РЕПЛИКАЦИИ



Б. РАСПЛЕТЕНИЕ В ОДНОМ НАПРАВЛЕНИИ



В. РАСПЛЕТЕНИЕ В ОБОЕ СТОРОНЫ

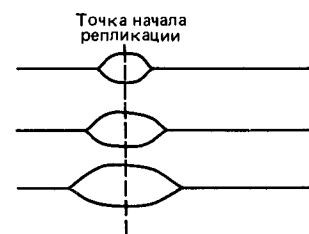
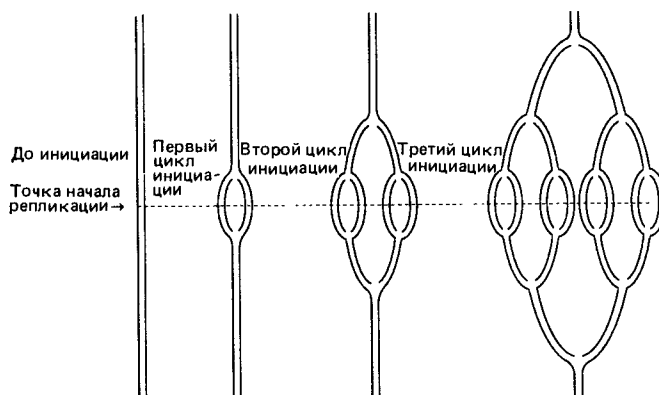


Рис. 9-40. Использование рестриктаз для локализации сайта расплетания Т-антигеном относительно точки начала репликации вируса SV40 (ответ 9-20). Концы линейной молекулы образовались в результате расщепления рестриктазой.

Рис. 9-41. Многократная инициация в точке начала репликации вируса SV40, встроенного в хромосому (ответ 9-20).



SV40 в присутствии Т-антигена реплицируется так, как показано на рис. 9-41. Этот процесс называется репликацией «по типу капусты», поскольку в результате получается слоистая структура, напоминающая кочан капусты.

Литература: Dodson, M.; Dean, F.B.; Bullock, P.; Echols, H.; Hurwitz, J. Unwinding of duplex DNA from the SV40 origin of replication by T-antigen. Science 238, 964–967, 1987.

9-21

- А. ДНК из амплифицированного кластера представляет собой структуру типа капустного кочана, похожую на ту, что изображена на рис. 9-41. С помощью электронного микроскопа в ДНК фолликулярных клеток, находящихся на поздней стадии развития, обнаружены многочисленные скопления репликативных вилок, что соответствует модели амплификации по типу кочана капусты.
- Б. Если активируется каждая точка начала репликации, то за каждый цикл репликации число копий генов хорионических белков будет удваиваться. Таким образом, для 60-кратного увеличения должно пройти шесть циклов репликации ($2^6 = 64$).
- В. Чтобы стимулировать избыточную репликацию кластера генов, кодирующих белки хориона, контролирующей амплификацию элемент, размер которого составляет 510 нуклеотидов, должен находиться в точке начала репликации. Однако этот элемент не может представлять собой обычную точку начала репликации; в нем должны также содержаться последовательности, которые на определенных стадиях развития фолликулярных клеток препятствуют блокаде повторной репликации. Поскольку механизм блокады неизвестен, трудно строить предположения о том, из-за чего он мог бы не сработать. Однако представляется вероятным, что белки фолликулярных клеток, специфичные для определенных стадий развития, связываются с точкой начала репликации или вблизи нее, в результате чего этот сайт сохраняет свою активность. Может также оказаться, что сама по себе эта точка начала репликации нечувствительна к блокаде повторной репликации, но активна лишь в фолликулярных клетках, находящихся на определенной стадии развития (подобно встроенной в хромосому точке начала репликации SV40, которая «молчит» в отсутствие Т-антигена; см. задачу 9-20). С другой стороны, эта точка начала репликации может быть активна во всех тканях, но становится нечувствительной к блокаде повторной репликации, взаимодействуя со специфическим белком, присутствующим в фолликулярных клетках.



Рис. 9-42. Схема мечения цепей ДНК (ответ 9-22).

Литература: Orr-Weaver, T.L.; Spradling, A.C. *Drosophila* chorion gene amplification requires an upstream region regulating sl8 transcription. Mol. Cell. Biol. 6, 4624-4633, 1986.

9-22

- А. Три пика в градиенте плотности представляют собой (в направлении от «легкого» пика к «тяжелому») нереплицированную ДНК, ДНК, реплицированную один раз, и ДНК, реплицированную дважды (рис. 9-42). Инъектированная ДНК помечена ^3H , но во всех остальных отношениях это нормальная «легкая» ДНК. Каждая новосинтезированная цепь включает метку ^{32}P и БУДР, который увеличивает ее плотность. Следовательно, после одного цикла репликации ДНК будет обладать промежуточной плотностью и содержать одну «легкую» цепь, меченную ^3H , и одну «тяжелую», меченную ^{32}P . После второго цикла репликации из гибридной ДНК образуются один дуплекс, гибридный по плотности, и один дуплекс, содержащий две «тяжелые» цепи, меченные ^{32}P . «Полностью тяжелый» дуплекс расположен в самой плотной области градиента. Поскольку «полностью легкая» ДНК не реплицировалась, в ней не будет содержаться ^{32}P , а так как «полностью тяжелая» ДНК содержит две новые цепи, в ней не будет присутствовать ^3H . Образование дискретных пиков в этом эксперименте имеет принципиальное значение, так как показывает, что мечение связано главным образом с репликацией, а не с репаративным синтезом. Если бы включение метки было связано с репаративным синтезом, который осуществляется мозаично, то метка распределялась бы по всему градиенту, а не собралась в дискретных пиках.
- Б. Инъектируемая ДНК имитирует ожидаемое поведение хромосомной ДНК в одном важном отношении: за один клеточный цикл она проходит только один цикл репликации. Об этом можно судить по отсутствию «полностью тяжелой» ДНК после прохождения одного клеточного цикла. Однако в другом отношении поведение инъектированной ДНК значительно отличается от поведения клеточной ДНК: большая фракция инъектированной ДНК не реплицируется даже после двух клеточных циклов. Отсутствие репликации проявляется в сохранении «полностью легкого» пика ДНК. Неясно, почему часть инъектированной ДНК не реплицируется. Возможно, некоторые клетки при использовании данной методики становятся некомпетентными.
- В. Поскольку циклогексимид подавляет белковый синтез, он не должен прямо действовать на синтез ДНК. И действительно, в присутствии циклогексимида один цикл репликации завершается нормально, но после этого репликация прекращается. Вероятно, циклогексимид подавляет следующий клеточный цикл потому, что ключевые события в этом процессе зависят от синтеза белка. Важно, что ДНК не реплицируется повторно, пока клетка не пройдет весь цикл.

Литература: Harland, R.M.; Laskey, R.A. Regulated replication of DNA microinjected into eggs of *Xenopus laevis*. Cell 21, 761-771, 1980.

Синтез и процессинг РНК

9-23

- А. РНК-полимераза
 Б. фактор инициации
 В. факторы элонгации
 Г. РНК-полимераза II; РНК-полимераза I; РНК-полимераза III

- Д. факторы транскрипции
- Е. ТАТА-фактор; ТАТА-бокс
- Ж. транскрипционная единица
- З. гетерогенная ядерная РНК (гяРНК)
- И. матричная РНК (мРНК)
- К. 5'-кэп
- Л. poly(A)-«хвост»
- М. первичный транскрипт РНК
- Н. сплайсинг РНК
- О. гяРNP (гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин)
- П. мяРNP (малые ядерные рибонуклеопротеины)
- Р. 5'-сайт сплайсинга, 3'-сайт сплайсинга
- С. сплайсосома
- Т. синдром талассемии
- У. ядрышко
- Ф. ядрышковый организатор

9-24

- А. Неправильно. Факторы инициации и элонгации не присутствуют постоянно в составе фермента. Они временно соединяются с ферментом на стадии инициации или элонгации синтеза РНК.
- Б. Неправильно. РНК-полимеразы I, II и III структурно похожи друг на друга, и некоторые субъединицы у них общие, но другие уникальны.
- В. Правильно.
- Г. Правильно.
- Д. Неправильно. 3'-конец большинства транскриптов, синтезируемых РНК-полимеразой II, определяется не точкой терминации транскрипции, а сайтом расщепления цепи РНК, который находится через 10–30 нуклеотидов после последовательности AAUAAA.
- Е. Правильно.
- Ж. Правильно.
- З. Неправильно. Как частицы гяРNP, так и частицы мяРNP состоят из многих полипептидных цепей, образующих комплекс с РНК. Однако частицы гяРNP содержат мРНК, которая весьма нестабильна.
- И. Неправильно. Несмотря на то что интронные последовательности в основном удаляются, они должны быть вырезаны очень точно, поскольку ошибка даже на один нуклеотид приведет к сдвигу рамки считывания в образовавшейся молекуле РНК и сделает бессмысленной всю матрицу.
- К. Правильно.
- Л. Правильно.
- М. Неправильно. 28S-рРНК, 18S-рРНК и 5,8S-рРНК транскрибируются как части одного большого предшественника – 45S-РНК, который затем разрезается с образованием одной копии каждой из трех рРНК. Образование этих трех рРНК из одного первичного транскрипта гарантирует, что они будут синтезированы в одинаковых количествах.
- Н. Неправильно. Рибосомные РНК упаковываются вместе с рибосомными белками в ядрышке.
- О. Правильно.
- П. Правильно.
- Р. Неправильно. Интерфазные хромосомы стремятся занять в интерфазном ядре определенные области, и маловероятно, что они сильно переплетены с другими хромосомами.

9-25

А. На дорожке 4 отсутствует транскрипт размером 400 нуклеотидов (рис. 9-20), так как в реакционной смеси присутствовал GTP. GTP обеспечивает возможность того, чтобы транскрипция продолжалась дальше последовательности, не содержащей С, в результате чего образуются транскрипты размером более 400 нуклеотидов. В отсутствие GTP (дорожка 2) транскрипция не может продолжаться за пределами не содержащей С последовательности (С-минус). В присутствии GTP и РНКазы T1 (дорожки 6 и 8) более длинные транскрипты расщепляются у первого G с образованием транскрипта размером 400 нуклеотидов.

Б. Одна из трудностей, возникающих при изучении функционирования промотора *in vitro*, связана с высокой фоновой неспецифической инициацией транскрипции. Именно этот фон так сильно проявляется на дорожке 3. Причины его возникновения до конца не ясны, однако транскрипция может начинаться и с последовательностей в остальной части плазмиды, имеющих некоторое сходство с настоящими промоторами РНК-полимеразы II.

В. Транскрипт размером 400 нуклеотидов присутствует на дорожке 5, потому что в результате расщепления РНКазой T1 он высвобождается из любых случайно иницированных транскриптов, считывание которых проходило через последовательность С-минус. Фактически он на несколько нуклеотидов длиннее, чем специфически иницированный транскрипт, так как его 5'-конец определяется первым G, который предшествует последовательности С-минус.

Транскрипт размером 400 нуклеотидов отсутствует на дорожке 7, поскольку 3'-О-метил-GTP приводит к терминации большинства транскриптов, иницируемых перед последовательностью С-минус. Комбинация 3'-О-метил-GTP и РНКазы T1 фактически приводит к исчезновению всего фонового синтеза с контрольной плазмиды.

Г. Определение специфической транскрипции в грубых экстрактах (то есть в присутствии GTP) не должно представлять особых трудностей. Как показано на рис. 9-20 (дорожки 7 и 8), специфическую транскрипцию можно определить в присутствии G-нуклеотидов, если в реакционную смесь добавлены 3'-О-метил-GTP и РНКазы T1 (для подавления фоновой транскрипции и расщепления всех случайных транскриптов на мелкие фрагменты).

Литература: Sawadogo, M.; Roeder, R.G. Factors involved in specific transcription by human RNA polymerase II: analysis by a rapid and quantitative *in vitro* assay. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4394-4398, 1985.

9-26

А. Эффективность транскрипции, рассчитанная для области плато, составляет $7,2 \times 10^9$ транскриптов на одну реакцию. Действительно, в ходе реакции включается 2,4 пмоль СМР, и длина каждого транскрипта составляет 400 нуклеотидов, из которых 200 нуклеотидов приходится на СМР.

$$\begin{aligned} \frac{\text{Транскрипты}}{\text{Реакция}} &= \frac{2,4 \text{ пмоль СМР}}{\text{Реакция}} \times \frac{6 \times 10^{23} \text{ СМР}}{\text{моль}} \times \\ &\times \frac{\text{моль}}{10^{12} \text{ пмоль}} \times \\ &\times \frac{\text{Транскрипт}}{200 \text{ СМР}} = 7,2 \times 10^9 \text{ транскрипт/реакция.} \end{aligned}$$

- Б. В одной реакции участвует $1,0 \cdot 10^{11}$ матриц. При концентрации 16 мкг/мл в 25 мкл реакционной смеси содержится 0,4 мкг матрицы ($16 \times 0,025 = 0,4$). Каждая матрица содержит 3500 пар нуклеотидов (п. н.).

$$\frac{\text{Матрицы}}{\text{Реакция}} = \frac{0,4 \text{ мкг}}{\text{Реакция}} \times \frac{6 \times 10^{17} \text{ Да}}{\text{мкг}} \times \frac{\text{п. н.}}{660 \text{ Да}} \times \frac{\text{Матрица}}{3500 \text{ п. н.}} = 1,0 \cdot 10^{11} \text{ матрица/реакция.}$$

- В. На одну матрицу приходится около 0,07 транскриптов, что эквивалентно примерно одному транскрипту РНК на 14 матричных молекул:

$$\frac{\text{Транскрипты}}{\text{Матрица}} = \frac{7,2 \times 10^9 \text{ транскриптов}}{\text{Реакция}} \times \frac{\text{Реакция}}{1,0 \times 10^{11} \text{ матриц}} = 0,07 \text{ транскрипт/матрица.}$$

Низкая эффективность вашей реакции типична для транскрипции *in vitro*. Соотношение 1 транскрипт на 14 матриц не обязательно свидетельствует о том, что в синтезе РНК участвует 1 из 14 матричных молекул. Может оказаться, что на гораздо меньшем числе матриц синтезируется большое число транскриптов. Например, на одной из 140 матричных молекул может синтезироваться 10 транскриптов.

Литература: Sawadogo, M.; Roeder, R.G. Factors involved in specific transcription by human RNA polymerase II: analysis by a rapid and quantitative *in vitro* assay. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4394-4398, 1985.

9-27

- А. Для обеспечения доступности промотора при сборке хроматина достаточно, чтобы во время предынкубации в смеси присутствовал только TFIID. Подобное заключение основано на том, что на дорожке 6 (рис. 9-22) транскрипт отсутствует, а на дорожках 4, 5, 7 и 8 он имеется. Если бы требовался любой другой компонент, его отсутствие привело бы к прекращению транскрипции в одном из этих случаев. Фактор транскрипции TFIID связывается с ТАТА-боксом промоторов РНК-полимеразы II. Его присоединение способствует такой сборке нуклеосом, которая не препятствует транскрипции.
- Б. Результаты, приведенные на рис. 9-22 (дорожки 9, 10, 11 и 13) свидетельствуют о том, что TFIIA, TFIIB и РНК-полимераза II в присутствии TFIID могут образовывать с промотором комплекс, который оказывается стабильным при сборке и выделении хроматина.
- В. Как свидетельствуют результаты эксперимента (рис. 9-22, дорожка 12), для того, чтобы шла транскрипция, необходимо добавить только фактор транскрипции TFIIE, поскольку все остальные компоненты уже содержались в смеси во время предынкубации.

Литература: Workman, J.L.; Roeder, R.G. Binding of transcription factor TFIID to the major late promoter during *in vitro* nucleosome assembly potentiates subsequent initiation by RNA polymerase II. Cell 51, 613-622, 1987.

9-28

- А. Поскольку РНК-полимераза блокируется пиримидиновыми димерами, чувствительность транскрипции гена будет зависеть от расстояния между промотором и зондом; это расстояние прямо пропорционально протяженности мишени, повреждаемой ультрафиолетом. Так, если для образования транскрипта полимераза должна пройти в два раза большее расстояние, то и вероятность, что она натолкнется на участок, блокирующий транскрипцию, возрастает в два раза.
- Б. Транскрипция гена VSG в семь раз чувствительнее к облучению ультрафиолетом, чем транскрипция генов рибосомной рРНК в области зонда 4, расположенного на расстоянии 7 т. п. н. от своего промотора. Следовательно, начало гена VSG отстоит от промотора на расстояние примерно 50 т. п. н. (7×7). В этих расчетах принимается, что ДНК, расположенная между промотором VSG и геном VSG, обладает примерно такой же чувствительностью к ультрафиолету, что и транскрипционная единица рибосомной РНК.
- В. Если близлежащий ген примерно на 20% менее чувствителен к ультрафиолетовому облучению, чем ген VSG, то скорость его инактивации составляет 80% от скорости инактивации гена VSG. Следовательно, его промотор расположен на расстоянии 40 т. п. н. ($0,80 \times 50$ т. п. н.). Если близлежащий ген находится перед геном VSG на расстоянии 10 т. п. н., то его промотор должен картироваться где-то совсем рядом с промотором гена VSG. Следовательно, представляется весьма вероятным, что эти гены транскрибируются с одного и того же промотора.

Литература: Johnson, P. J.; Kooter, J. M.; Borst, P. Inactivation of transcription by UV irradiation of *T. brucei* provides evidence for a multicistronic transcription unit including a VSG gene. *Cell* 51, 273-281, 1987.

9-29

Одноцепочечные «хвосты» возникают потому, что концы мРНК некомплементарны концам рестриктов. Следовательно, один из одноцепочечных хвостов с каждой стороны это ДНК рестрикционного фрагмента. Одноцепочечный хвост на одном конце должен соответствовать 5'-концу мРНК, которая могла бы образоваться на предыдущем экзоне, не представленном в данном рестрикте. Одноцепочечный хвост на другом конце соответствует отсутствующему в рестрикте 3'-концу мРНК, которая могла бы образоваться на нижележащем экзоне, или это просто poly(A)-конец. Без дополнительной информации невозможно решить, каково происхождение каждого одноцепочечного конца.

Литература: Berget, S. M.; Berk, A. J.; Harrison, T.; Sharp, P. A. Spliced segments at the 5' termini of adenovirus-2 late mRNA: a role for heterogeneous nuclear RNA in mammalian cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 523-529, 1977.

9-30

- А. Были помечены 5'-концы молекул РНК. На радиоавтограмме проявляются лишь меченые фрагменты (рис. 9-25). Следовательно, если самые короткие фрагменты (те, которые доходят до конца геля) относятся к 5'-концу, то 5'-конец должен нести метку.
- Б. Полосы, соответствующие адениловым нуклеотидам в сигнальной последовательности AAUAAA, отсутствуют в случаях полиаденилированной и расщепленной РНК (рис. 9-25, дорожки 3 и 4) потому,

- что модификация любого из этих А препятствует расщеплению и полиаденилированию. Таким образом, молекулы РНК, несущие единственную модификацию в сигнальной последовательности, не узнаются компонентами экстракта и в результате не выявляются ни в популяции полиаденилированных молекул (дорожка 3), ни в популяции молекул, подвергшихся расщеплению (дорожка 4).
- В. Полоса А, указанная на рис. 9-25 стрелкой, отсутствует в случае полиаденилированной РНК, однако выявляется в расщепленной РНК, поскольку модификация этого А не препятствует расщеплению, но мешает полиаденилированию. Именно поэтому молекулы РНК с модификацией этого А в популяции расщепленных молекул содержатся, а в популяции полиаденилированных молекул — нет (дорожка 3).
- Г. Проведенный в пунктах Б и В анализ отсутствующих полос показывает, что для расщепления молекул РНК-предшественника важна сигнальная последовательность AAUAAA, а для полиаденилирования необходимы эта последовательность и еще один А.
- Д. Если пометить другой, а именно 3'-конец молекулы РНК, то можно определить, принимают ли участие в полиаденилировании какие-либо из А и С на 3'-конце участка расщепления. Такие эксперименты были проведены, и оказалось, что ни одна модификация на 3'-конце участка полиаденилирования не препятствует полиаденилированию.

Литература: Conway, L.; Wickens, M. Analysis of mRNA 3'-end formation by modification interference: the only modifications which prevent processing lie in AAUAAA and the poly(A) site. EMBO J. 6, 177-184, 1987.

9-31

- А. Ваша идея состояла в том, чтобы добиться расщепления РНК, входящей в состав мяРНК. Эта РНК, как вы полагаете, взаимодействует с консервативной последовательностью на 3'-конце предшественника гистоновой мРНК. Если взаимодействие мяРНК с РНК-предшественником сводится к гибридизации, то олигонуклеотид, комплементарный последовательности в составе РНК-предшественника, должен гибридизоваться с мяРНК. Образование гибрида ДНК-РНК сделает мяРНК чувствительной к расщеплению РНКазой Н. Расщепление же мяРНК в этом важном участке взаимодействия должно привести к потере экстрактом способности осуществлять процессинг предшественника. Этот результат вы и получили для обобщенного олигонуклеотида и олигонуклеотида мыши.
- Б. Неспособность олигонуклеотида человека блокировать процессинг — это неожиданный результат опыта, в котором использовали экстракт из клеток человека. Однако изучение гибридов, которые могут образовываться между различными олигонуклеотидами и U7-мяРНК, показывает, что обобщенный олигонуклеотид и олигонуклеотид мыши образуют совершенные гибриды длиной 9 и 10 нуклеотидов соответственно (рис. 9-43). Напротив, продукт гибри-

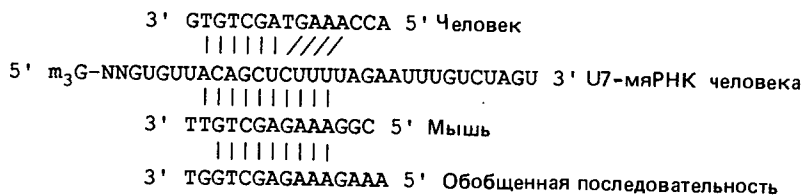


Рис. 9-43. Спаривание между тремя олигонуклеотидами и U7-мяРНК человека (ответ 9-31).

Рис. 9-44. Сумма отличий от последовательности гена β -глобина коровы (ответ 9-32). Последовательность гена β -глобина коровы сравнивали по каждому нуклеотиду с последовательностями генов β -глобина шести других видов. Суммарное число различий по данной позиции приведено под каждым нуклеотидом последовательности для β -глобина. Общие суммы различий с каждой стороны границы экзон/интрон (пунктирная линия) приведены внизу.

GGTGGTGAGGCCCTGGGCAG	GTAGGTATCCCACTTACAAG
00312100211100012000	00311023345563332333
15	53
Экзон	Интрон

дизации с олигонуклеотидом человека содержит один неспарившийся нуклеотид, который делит молекулу на два фрагмента размером 6 и 4 нуклеотида (рис. 9-43). Стабильность спаривания двух отдельных фрагментов не так велика, как у молекулы, все основания которой спарены. Следовательно, олигонуклеотид человека не будет спариваться с той эффективностью, которой было бы достаточно, чтобы сделать U7-мРНК чувствительной к расщеплению РНКазой Н.

Литература: Mowry, K. L.; Steitz, J. A. Identification of human U7 snRNP as one of several factors involved in the 3'-end maturation of histone pre-messenger RNAs. *Science* 238, 1682-1687, 1987.

9-32

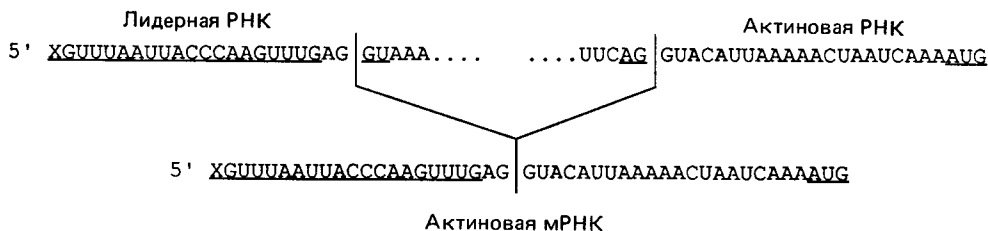
Поскольку интроны эволюционируют быстрее, чем экзоны, они и варьируют у разных видов в большей степени, чем экзоны. Сопоставить все эти последовательности и достоверно определить, какая их сторона более консервативна, без компьютера трудно. Приемлемым способом оценки различий может быть такой: выбрать одну из последовательностей, например коровы, и подсчитать все отличия между этой и другими последовательностями по каждому положению, как показано на рис. 9-44. При суммировании различий с каждой стороны от границы становится очевидным, что последовательности слева гораздо больше сходны друг с другом, чем последовательности справа (рис. 9-44). (Аналогичные различия выявляются вне зависимости от того, какая последовательность выбрана для сравнения.) Таким образом, более консервативные последовательности, расположенные на рис. 9-27 слева, соответствуют экзонам, а менее консервативные, расположенные справа, интронам.

Это простое упражнение лишний раз показывает, насколько полезны компьютеры при оценке гомологии между различными последовательностями.

9-33

- А. Если молекулы РНК соединяются в ходе сплайсинга, то должны существовать последовательность на 5'-сайте сплайсинга (GU) в лидерной РНК и последовательность на 3'-сайте сплайсинга (AG) в актиновой РНК, которые при соединении, согласно обычным правилам сплайсинга, образуют последовательности актиновой мРНК. Как показано на рис. 9-45, при сплайсинге лидерная РНК и актиновая РНК могли бы соединиться так, что образовалась бы

Рис. 9-45. Сплайсинг лидерной РНК и актиновой РНК с образованием актиновой мРНК (ответ 9-33). Подчеркнуты GU в 5'-сайте сплайсинга лидерной РНК и AG в 3'-сайте сплайсинга актиновой РНК. Подчеркнуты также лидерные фрагменты, идентифицированные путем сравнения последовательностей, и сайты начала трансляции.



активная мРНК с правильной последовательностью. Если молекулы РНК соединяются путем сплайсинга, то ген, кодирующий лидерную последовательность, фактически вносит 22 нуклеотида в активную мРНК.

- В. Последовательности лидерной РНК и активной РНК не могут быть составными частями одного предшественника, поскольку гены 1, 2 и 3 транскрибируются в разных направлениях. Наблюдение, что гены, кодирующие лидерную РНК, по-видимому, транскрибируются с образованием дискретной молекулы размером 100 нуклеотидов, более слабый аргумент против существования предшественника. Поскольку гены лидерной РНК повторены около 100 раз, трудно исключить вероятность того, что один или несколько из них дают начало более длинному транскрипту.
- В. Наличие необходимых сигналов сплайсинга, который мог бы приводить к образованию активной мРНК правильной структуры, а также невозможность существования одного длинного предшественника — два этих факта позволяют предположить, что лидерная РНК соединяется с активной РНК при сплайсинге двух отдельных молекул РНК. Из литературы известен пример *транс-сплайсинга* (т.е. сплайсинга двух отдельных молекул РНК) — это синтез мРНК у паразита *Trypanosoma brucei*, когда ко всем мРНК присоединяется общая лидерная последовательность.

Литература: Krause, M.; Hirsh, D. A trans-spliced leader sequence on actin mRNA in *C. elegans*. Cell 49, 753–761, 1987.

9-34

- А. Если структуры, осуществляющие сплайсинг, связываются с одним сайтом сплайсинга и сканируют весь интрон в поисках комплементарного сайта сплайсинга, то они должны использовать первый подходящий сайт. (Неиспользование первого подходящего сайта сплайсинга эквивалентно пропуску экзона.) Продукты, которые должны получиться в результате сканирования интрона в двух мини-генах, показаны на рис. 9-46. Если указанные структуры связываются с 5'-сайтом сплайсинга и сканируют последовательность по направлению к 3'-сайту сплайсинга, то на мини-гене 1 должен образовываться один продукт (рис. 9-46, А), а на

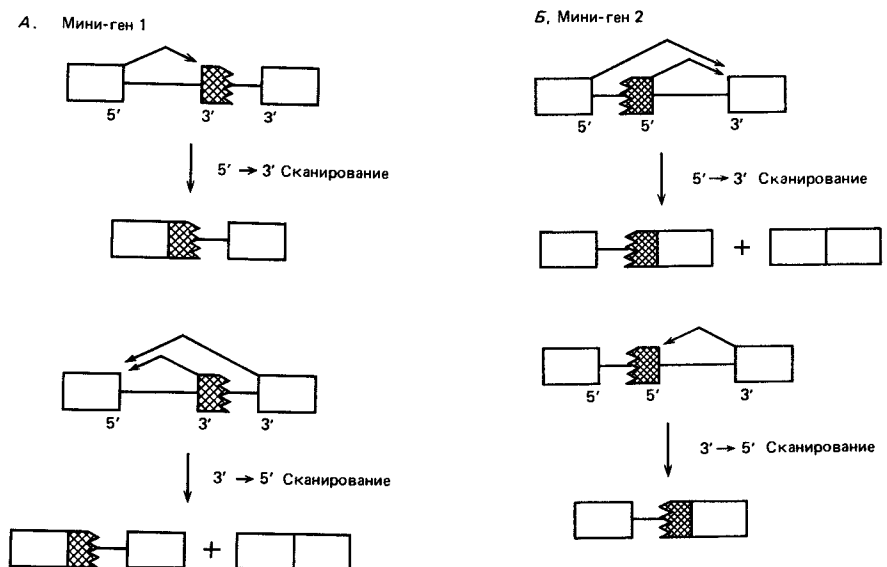


Рис. 9-46. Ожидаемые продукты для мини-гена 1 (А) и мини-гена 2 (Б) при сканировании последовательности от 5'-к 3'-концу и от 3'-к 5'-концу (ответ 9-34). Прямоугольниками обозначены целые экзоны, заштрихованными фигурами показаны части экзонов.

мини-гене 2—два продукта (рис. 9-46, Б). Наоборот, если структуры, осуществляющие сплайсинг, связываются с 3'-сайтом сплайсинга и сканируют в направлении 5'-сайта сплайсинга, на мини-гене 1 должно образоваться два продукта (рис. 9-46, А), а на мини-гене 2—один продукт (рис. 9-46, Б).

Б. Результаты вашего эксперимента не совпадают с ожидаемыми для любого направления сканирования. Таким образом, представляется маловероятным, что отбор сайтов сплайсирования происходит путем однонаправленного сканирования интронов либо от 5'- к 3'-сайту, либо от 3'- к 5'-сайту. Каким образом клетки не допускают пропуска экзона, остается неясным.

Литература: *Kuhne, T.; Wieringa, B.; Reiser, J.; Weissmann, C.* Evidence against a scanning model for RNA splicing. *EMBO J.* 2, 727–733, 1983.

Стратегии генетического контроля**10-1**

- А. транскрипция
- Б. процессинг РНК
- В. транспорт РНК
- Г. трансляция
- Д. деградация мРНК
- Е. активность белка
- Ж. белки – регуляторы генов
- З. позитивная регуляция; негативная регуляция
- И. комбинационная
- К. главные белки-регуляторы
- Л. myoD1

10-2

- А. Правильно.
- Б. Неправильно. При таком сравнении выявляется очень немного различий. Большинство белков синтезируются в различных типах клеток со скоростями, различающимися не более чем в пять раз. Лишь немногие белки (несколько процентов от всего количества) сильно варьируют по своему содержанию в разных тканях.
- В. Правильно.
- Г. Неправильно. Некоторые белки-регуляторы, связавшись с узнаваемой ими последовательностью, подавляют транскрипцию соседнего гена.
- Д. Правильно.
- Е. Неправильно. У высших эукариот возможность транскрипции гена зависит обычно от целого кластера белков-активаторов, действующих согласованно.
- Ж. Правильно.
- З. Правильно.

10-3

- А. Перед обработкой форболовым эфиром белок NF- κ B присутствует в цитоплазме (рис. 10-1, дорожки 5 и 6). После обработки NF- κ B обнаруживается в ядре (дорожки 3 и 4). В результате обработки форболовым эфиром NF- κ B перемещается из цитоплазмы в ядро.
- Б. Несмотря на то что обработка форболовым эфиром активирует протеинкиназу С, которая может менять активность белков-мишеней путем фосфорилирования, представляется маловероятным, что NF- κ B активируется непосредственно путем фосфорилирования. Активация NF- κ B при обработке мягко денатурирующими ве-

ществами дает возможность предположить, что переход неактивной формы этого белка в активную не связан с ковалентной модификацией. Более вероятно, что эффект протеинкиназы С отстоит от активации NF- κ B по крайней мере на одну ступень.

- В. Возможно, активация NF- κ B в пре-B-клетках форболовым эфиром осуществляется за счет простого молекулярного механизма: NF- κ B неактивен потому, что связан с ингибитором. В пользу такого предположения говорит то, что NF- κ B активируется при обработке мягко денатурирующими веществами, которые могут приводить к отделению ингибирующей субъединицы. Ингибитор может действовать, закрывая участок связывания NF- κ B с энхансером, а, возможно, также и участок, определяющий локализацию этого белка в ядре. В соответствии с этим предположением обработка форболовым эфиром должна приводить к активации NF- κ B, вызывая отделение ингибитора. Так как обычно при обработке форболовым эфиром активируется протеинкиназа С, то диссоциация ингибитора может происходить либо вследствие прямого фосфорилирования ингибитора, либо косвенным путем, вследствие фосфорилирования какого-то другого белка.

Литература: Baeuerle, P. A.; Baltimore, D. Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF- κ B transcription factor. *Cell* 53, 211-217, 1988.

10-4

- А. Результаты, приведенные в табл. 10-1, соответствуют ожидаемым в случае позитивной регуляции арабинозного оперона. Для стимуляции транскрипции позитивный регулятор транскрипции должен связаться с промоторными областями арабинозного оперона. Таким образом, если ген, кодирующий белок-регулятор, делецирован, то арабинозные гены не могут экспрессироваться.
- Б. Если бы белок агаС действовал по принципу негативной регуляции экспрессии, то арабинозные гены должны были бы полностью индуцироваться независимо от того, присутствует или отсутствует арабиноза в среде. Поскольку регуляторы, осуществляющие позитивный контроль, блокируют транскрипцию, их удаление при делеции дало бы возможность арабинозным генам транскрибироваться при всех условиях. Бактериальные опероны, которые регулируются репрессором по принципу негативной регуляции (например, лактозный оперон), ведут себя именно таким образом: в отсутствие белка-репрессора их экспрессия осуществляется на высоком уровне.

Литература: Schlieff, R. F. *Genetics and Molecular Biology*, Chap. 13. Reading, MA: Addison Wesley, 1986.

10-5

- А. Зонды 2 и 3 нужны потому, что они являются специфическими для той мРНК, которой нет в необработанных клетках 10T1/2. Вы ищете мРНК, имеющуюся в миобластах обоих типов, но отсутствующую в клетках 10T1/2. Гибридизация радиоактивных кДНК-копий РНК из миобластов с РНК из клеток 10T1/2 проводится для того, чтобы удалить из зондов все те последовательности, которые соответствуют видам мРНК, содержащимся как в клетках 10T1/2, так и в миобластах. Подобная гибридизация с зондами, лишенными определенных последовательностей (безбалластная, или субтрактивная гибридизация), делает зонд более специфичным и позволяет исключить из анализа большой класс клонов кДНК,

которые, как вы предполагаете, не содержат искомого гена.

- Б. Клоны класса А содержат кДНК, соответствующие видам РНК, общим для трех типов клеток: 10T1/2, индуцированных и нормальных миобластов. В этом классе содержатся все обычно присутствующие в клетках гены «домашнего хозяйства». Это и есть тот класс клонов, который должен быть удален в результате субтрактивной гибридизации. Поскольку зонды 2 и 3 гибридизуются лишь с 1% клонов кДНК, выявляемых зондом 1, РНК, соответствующие генам домашнего хозяйства, должны составлять большую часть всех видов мРНК, присутствующих в клетках.

Клоны класса В содержат молекулы кДНК, соответствующие тем молекулам РНК, которые были индуцированы обработкой 5-аза-С, но отсутствуют в нормальных миоблестах и в клетках 10T1/2. Поскольку 5-аза-С приводит к деметилированию, то неудивительно, что это вещество активирует некоторые гены, которые в норме в миоблестах не экспрессируются.

Клоны класса С содержат кДНК, соответствующую той РНК, которая присутствует в нормальных миоблестах, но отсутствует в миоблестах, обработанных 5-аза-С. Если бы индуцированные миоблесты были идентичны нормальным миоблестам, такого класса клонов просто не существовало бы. Можно было бы подозревать в индуцированных миоблестах какой-то изъян, однако, по-видимому, все дело в популяции нормальных миобластов. Последняя содержит небольшую фракцию полностью дифференцированных миотрубочек, которые отсутствуют в популяции индуцированных миобластов. Таким образом, РНК, выделенная из популяции нормальных миобластов, включает и РНК клеток более дифференцированных типов. При анализе было обнаружено, что клоны класса С кодируют продукты генов, специфичные для мышц, такие, как тропонин I, а также тяжелая и легкая цепи миозина.

В клонх класса D содержится кДНК, соответствующая РНК, специфичной для миобластов. Именно в этих клонх вы надеетесь обнаружить ген-регулятор, контролирующий дифференцировку миобластов.

Реально ген, контролирующий, по-видимому, дифференцировку миобластов (*myoD1*), был обнаружен как раз в клонх этого класса. Он был идентифицирован с помощью тестов, основанных на следующих предположениях: 1) ген-регулятор не должен экспрессироваться вообще в клетках 10T1/2; 2) его экспрессия должна достигать максимума в миоблестах; 3) его экспрессия должна снижаться в миотрубочках и 4) он не должен экспрессироваться в таких клетках 10T1/2, которые не дифференцируются после обработки 5-аза-С. На последней стадии этих экспериментов клонированная кДНК была введена в клетки 10T1/2 и заставила эти клетки дифференцироваться в миоблесты. Убедительное доказательство!

Литература: Davis, R. L.; Weintraub, H.; Lassar, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell 51, 987-1000, 1987.

Контроль инициации транскрипции

10-6

А. промотор

Б. репрессор лактозного оперона

- В. репрессор; негативный контроль
- Г. позитивный; активатор гена
- Д. активатор катаболизма
- Е. сигма-фактор
- Ж. ТАТА-фактор (фактор транскрипции IID, TFIIID); транскрипционный комплекс
- З. элемент, расположенный перед промотором
- И. энхансер

10-7

- А. Неправильно. Аллолактоза связывается с репрессором лактозного оперона. Когда концентрация аллолактозы становится достаточно высокой, она связывается с репрессором и вызывает такие аллостерические изменения конформации, которые приводят к ослаблению связи репрессора с ДНК, тем самым обеспечивая возможность транскрипции.
- Б. Правильно.
- В. Правильно.
- Г. Неправильно. Действие на расстоянии у прокариот встречается реже, чем у эукариот, но не является необычным. Например, фосфорилированная форма белка *ptgC* может стимулировать транскрипцию, даже если сайты связывания этого белка удалены от промотора на расстояние более 1000 п. н.
- Д. Неправильно. Сигма-факторы взаимодействуют со специфической последовательностью ДНК, но лишь тогда, когда они входят в состав РНК-полимеразы. Аналогичным образом белки-активаторы взаимодействуют с РНК-полимеразой, но лишь в том случае, когда они связаны со своими специфическими сайтами узнавания в ДНК.
- Е. Правильно.
- Ж. Правильно.
- З. Неправильно. Лишь немногие энхансеры активны почти во всех типах клеток. Большинство из них хорошо работает лишь в некоторых типах клеток.
- И. Правильно.
- К. Неправильно. Кроме связывания с низкомолекулярными веществами у эукариот есть и другие механизмы активации регуляторных белков, включая синтез белка, фосфорилирование и эффект регуляторных субъединиц.
- Л. Правильно.

10-8

- А. Быстрый рост бактерий в начале эксперимента происходит в результате метаболизма глюкозы, а замедленный рост в конце — вследствие метаболизма лактозы. Бактерии переставали расти в середине эксперимента, поскольку они уже исчерпали всю глюкозу, но у них еще не было ферментов, необходимых для метаболизма лактозы. Перед тем как они смогут использовать лактозу, содержащуюся в среде, в них должна произойти индукция *lac*-оперона. Задержка роста приходится как раз на то время, когда происходит индукция.
- Б. Для индукции лактозного оперона необходимы два условия: в среде должна содержаться лактоза, а глюкозы быть не должно. В первой части эксперимента в среде присутствуют и глюкоза, и лактоза, следовательно, это требование не выполняется. Лишь когда вся глюкоза оказывается израсходованной, создаются условия, необходимые для индукции.

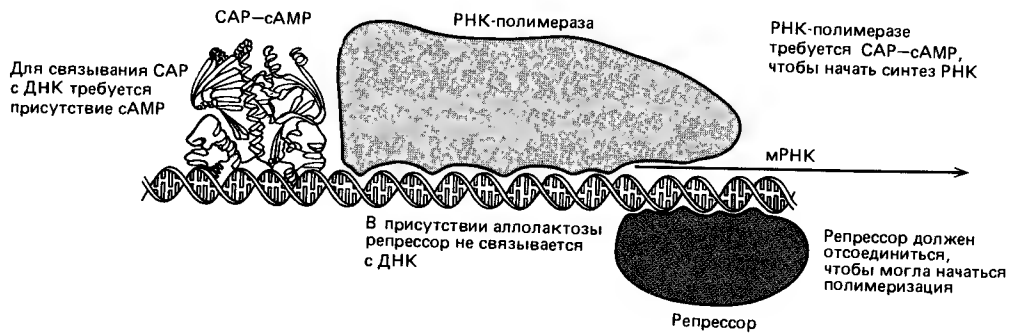


Рис. 10-29. Индукция *lac*-оперона (ответ 10-8). Белки и ДНК изображены примерно в одном масштабе. Трехмерная структура CAP известна, а структуры РНК-полимеразы и репрессора еще не определены.

В индукции участвуют CAP и репрессор лактозного оперона (рис. 10-29). Для включения оперона CAP должен связаться с ним, а репрессор лактозного оперона должен отделиться. Присутствие лактозы в среде способствует повышению внутриклеточной концентрации аллолактозы, которая связывается с лактозным репрессором, вследствие чего происходит снижение его сродства к соответствующему сайту связывания и в результате — отсоединение от ДНК. С удалением лактозного репрессора удовлетворяется одно условие индукции. Второе условие связано с концентрацией глюкозы. При снижении концентрации глюкозы внутриклеточный уровень сАМР повышается; сАМР связывается с CAP и изменяет его конформацию таким образом, что тот становится способным взаимодействовать со своим сайтом связывания. Когда CAP присоединен (а репрессор лактозного оперона отсутствует), РНК-полимераза может связаться с промотором и начать транскрипцию.

Литература: Monod, J. The phenomenon of enzymatic adaptation. Growth Symposium XI: 223–289, 1947. [Reprinted in Selected Papers in Molecular Biology by Jacques Monod (A. Lwoff, A. Ullmann, eds.), pp. 68–134. New York: Academic Press, 1947.]

10-9

- А. РНК-полимераза в отсутствие *ntgC* может связываться с промотором гена глутаминсинтетазы, однако она не способна индуцировать транскрипцию, поскольку находится в закрытом комплексе. Взаимодействие с фосфорилированным белком *ntgC* дает возможность РНК-полимеразе образовать открытый комплекс и таким образом начать транскрипцию.
- Б. Белок *ntgC* может связываться со своими сайтами связывания независимо от того, фосфорилирован он или нет, однако активировать РНК-полимеразу он не может, пока не будет фосфорилирован. Лишь фосфорилированный белок *ntgC* способен связаться с РНК-полимеразой и стимулировать образование открытого комплекса, способствуя таким образом началу транскрипции.
- В. Транскрипция может стимулироваться фосфорилированным белком *ntgC* и в отсутствие связывающих его сайтов, но для этого необходимы высокие концентрации белка *ntgC*. Сайты связывания с белком *ntgC* служат для повышения его концентрации вблизи промотора гена глутаминсинтетазы. В отсутствие сайтов связывания *ntgC* необходимая высокая концентрация этого белка может послужить причиной ненужной активации РНК-полимераз, связанных с другими промоторами. Наличие сайтов связывания *ntgC* обеспечивает активацию гена глутаминсинтетазы при таких относительно низких концентрациях белка *ntgC*, когда промоторы, не имеющие сайтов связывания *ntgC*, не активируются.

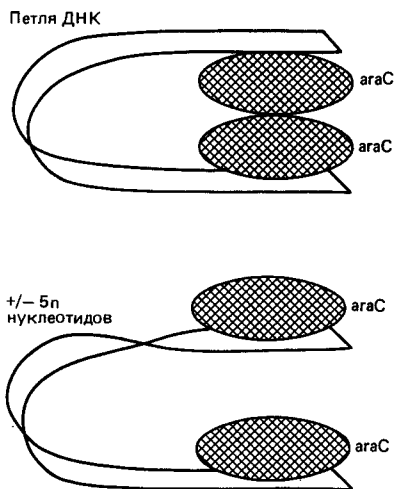


Рис. 10-30. Схема, показывающая результат введения полувитка в петлю ДНК, образованную в результате взаимодействия двух белков (ответ 10-10).

Литература: Ninfa, A. J.; Reitzer, L. J. Magasanik, B. Initiation of transcription at the bacterial *glnAp2* promoter by purified *E. coli* components is facilitated by enhancers. Cell 50, 1039–1046, 1987.

10-10

Можно предполагать, что ни распространение изменений в структуре ДНК, ни олигомеризация белка от сайта репрессии не будут чувствительны к небольшим изменениям расстояния между сайтом репрессии и точкой начала транскрипции. Из этих механизмов не следует, что некоторые вставки и делеции должны препятствовать репрессии, а другие — поддерживать ее.

Третий механизм — образование петли ДНК — согласуется с результатами наблюдений. Репрессия гена *galK* происходит в том случае, когда к ДНК добавляется или в ней делетируется целое число витков (при том, что 10,5 нуклеотида приходится на один виток спирали). Напротив, когда это число витков составляет половину целого числа, репрессия не осуществляется. Именно этого и следовало ожидать, если ДНК должна изогнуться с образованием напряженной петли, чтобы белок *araC*, находящийся в сайте 2, мог взаимодействовать с другим белком, расположенным вблизи точки начала транскрипции. Как показано на рис. 10-30, изменение на нецелое число витков приведет к тому, что белок *araC* окажется не с той стороны ДНК, и для того, чтобы этот белок оказался в правильном положении, потребуется еще полвитка ДНК. Хотя может показаться, что для ДНК не представляет особой трудности закрутиться еще на полвитка, но в случае ДНК длиной 200 нуклеотидов для этого потребуется около 4 ккал/моль. Энергия связывания при типичном взаимодействии ДНК — белок составляет лишь 10–15 ккал/моль. Поскольку значительная часть этой энергии ушла бы на закручивание ДНК, то вполне возможно, что в результате могло измениться тонко отрегулированное взаимодействие, необходимое для репрессии.

Из других экспериментов следует, что *araC* в сайте 2 может взаимодействовать с *araC*, расположенным в сайте 1, и образовывать при этом петлю ДНК. В отсутствие арабинозы гены *araBAD* полностью подавлены, возможно, из-за того, что петля препятствует посадке РНК-полимеразы. Если сайт связывания белка *araC* делетирован (или белок *araC* отсутствует вследствие мутации), петля ДНК не может образоваться и связыванию РНК-полимеразы ничего не препятствует — в результате наблюдается 10-кратное повышение уровня транскрипции кластера генов *araBAD*. В присутствии арабинозы (и в отсутствие глюкозы) белок *araC* подвергается конформационным изменениям, препятствующим образованию петли ДНК, что также облегчает связывание РНК-полимеразы либо способствует ее превращению в открытый комплекс, и в итоге транскрипция возрастает в 1000 раз.

Литература: Dunn, T. M.; Hahn, S.; Ogden, S.; Schlieff, R. F. An operator at —280 base pairs that is required for repression of *araBAD* operon promoter: addition of DNA helical turns between the operator and promoter cyclically hinders repression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5017–5020, 1984.

10-11

А. Способность фактора транскрипции стимулировать транскрипцию в ядерных экстрактах, начиная с делеции —61, но не с делеции —50, указывает на то, что критически важная часть сайта связывания фактора лежит в интервале между нуклеотидами —61 и —50, расположенными перед точкой начала транскрипции. Сами по себе

исследования с помощью делеций не позволяют определить конец сайта связывания, расположенный ближе всего к точке начала транскрипции, поскольку удаление части этого сайта будет препятствовать связыванию фактора. Однако эксперименты по футпринтингу ДНК свидетельствуют о том, что на самом деле фактор защищает последовательность размером 12 нуклеотидов, от -63 до -52.

- Б. На первый взгляд кажется противоречащим здравому смыслу, что добавление *стимулирующего* фактора приводит к исчезновению из геля транскриптов с матрицы, несущей делецию в положении -50. На самом деле никакого противоречия нет: стимулирующий фактор приводит к десяти-двадцатикратному повышению транскрипции со всех матриц, сохранивших связывающую последовательность. Таким образом, уровень транскрипции с матрицы, несущей делецию в положении -50, снижается *относительно* транскрипции со стимулированных матриц (и по этой причине полоса транскрипта с матрицы, несущей делецию, становится настолько менее интенсивной, что он кажется исчезнувшим).
- В. Громадная разница в стабильности связывания фактора в присутствии и в отсутствие TFIID позволяет предположить, что фактор связывается не только с ДНК, но и с TFIID. Таким образом, в присутствии TFIID стимулирующий фактор закрепляется на месте посредством двух взаимодействий (с ДНК и с TFIID), тогда как в отсутствие TFIID его связывание обусловлено одним типом взаимодействия (с ДНК).

Литература: Sawadogo, M.; Roeder, R.G. Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. Cell 43, 165-175, 1985.

10-12

- А. Запаздывающие полосы расположены в полиакриламидном геле на разных уровнях потому, что кодируемые кДНК белки имеют разные размеры. Поскольку подвижность комплекса ДНК-белок зависит от суммарной мол. массы, то самый короткий из связывающихся белков (кодируемый клоном 2 кДНК) замедляет миграцию фрагмента ДНК в наименьшей степени, а самый длинный из связывающихся белков (кодируемый клоном 4 кДНК) — в наибольшей.
- Б. Поскольку продукты клонов 2, 3 и 4 кДНК тормозят движение в геле, они должны кодировать домен связывания с энхансером. Слабое связывание белка, кодируемого кДНК из клона 2, показывает, что в последовательности мРНК отсутствует некоторая часть, необходимая для того, чтобы белок нормально связывался. Белок, кодируемый кДНК клона 1, совсем не связывается с энхансером, следовательно, в этом клоне не закодирован весь связывающий домен. Таким образом, весьма важная часть связывающего домена должна располагаться между 5'-концами клонов 1 и 2 кДНК. Эти опыты не позволяют определить, какова протяженность этого домена в направлении 3'-конца. 3'-конец связывающего домена можно определить точнее, если использовать набор делеций, которые затрагивают разные по длине участки со стороны 3'-конца при том, что 5'-конец остается интактным.
- В. Присутствие трех по-разному запаздывающих в геле полос, выявляемых при анализе смеси продуктов трансляции клонов 3 и 4 кДНК, указывает на взаимодействие данных белков. Появление одной новой полосы говорит о том, что в норме фактор транскрипции, связывающийся с энхансером, имеет форму димера.

Новые полосы появляются потому, что одна молекула, синтезируемая на кДНК клона 3, взаимодействует с одной молекулой, синтезируемой на кДНК клона 4, причем образуемый ими димер имеет промежуточную мол. массу по сравнению с димерами, состоящими из идентичных субъединиц. Промежуточная мол. масса определяет и то промежуточное положение, которое эта полоса занимает в геле.

Литература: Treisman, R. Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element. EMBO J. 6, 2711–2717, 1987.

Norman, C.; Runswick, M.; Pollock, R.; Treisman, R. Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. Cell, 55, 989–1003, 1988.

- 10-13** Две модели позволяют сделать два разных прогноза относительно активности мутантных рецепторов. Если ДНК-связывающий домен возникает при взаимодействии с гормоном, то мутантные рецепторы, у которых отсутствует домен связывания гормона, будут неспособны активировать экспрессию САТ. Напротив, если при связывании гормона открывается предсуществующий ДНК-связывающий домен, то некоторые мутантные репрессоры смогут конститутивно активировать экспрессию САТ (в присутствии или в отсутствие гормона) благодаря делеции той области белка, которая закрывает ДНК-связывающий домен.

Хотя для окончательного утверждения необходимо провести более детальные исследования на молекулярном уровне, все же экспериментальные данные подтверждают предположение о том, что предсуществующий домен связывания с ДНК маскируется доменом связывания гормона. Потери аминокислот в случае четырех мутантов с наиболее длинными С-концевыми сегментами (самыми короткими делециями), слишком велики для того, чтобы обеспечить связывание гормона, однако недостаточны для демаскировки ДНК-связывающего домена. У следующих четырех мутантов, которые конститутивно активируют экспрессию САТ, ДНК-связывающий домен не закрыт и это не зависит от связывания гормона. Два мутанта с самыми протяженными делециями неактивны, поскольку у них полностью отсутствует домен, взаимодействующий с ДНК.

Литература: Godowski, P.J.; Rusconi, S.; Miesfeld, R.; Yamamoto, K.R. Glucocorticoid receptor mutants that are constitutive activators of transcriptional enhancement. Nature 325, 365–368, 1987.

Молекулярно-генетические механизмы образования различных типов клеток

10-14

- А. фазовая вариация
- Б. спаривание
- В. тип спаривания (mating type locus, МАТ)
- Г. белок-репрессор (сI-белок); cго-белок
- Д. гетерохроматин
- Е. эффект положения мозаичного типа
- Ж. участок, контролирующий домен
- З. ДНК-гираза
- И. 5-метилцитозин (5-метил-С)
- К. CG-островки, «домашнее хозяйство»
- Л. тканеспецифические

10-15

- А. Неправильно. Фазовая вариация у *Salmonella* происходит в результате инверсии гена, а у *N. gonorrhoeae* – за счет конверсии генов.
- Б. Неправильно. Хотя исходный ген, присутствующий в локусе МАТ, в процессе переключения типа спаривания удаляется, все же переключение обратимо, поскольку информация, содержащаяся в генах как α -типа, так и а-типа, хранится в другом месте в виде молчащих генов.
- В. Неправильно. Молчащие гены содержат все необходимые для транскрипции регуляторные сайты. Они не экспрессируются из-за того, что последовательности ДНК, расположенные на некотором расстоянии за ними, каким-то образом блокируют их транскрипцию.
- Г. Правильно.
- Д. Правильно.
- Е. Неправильно. Конститутивный гетерохроматин находится в конденсированном состоянии во всех клетках, а факультативный гетерохроматин сконденсирован лишь в некоторых типах клеток.
- Ж. Правильно.
- З. Неправильно. С помощью диффундирующих белков-регуляторов нельзя объяснить наследование гетерохроматинизации определенных областей хромосомы, поскольку идентичные последовательности ДНК в активных и неактивных хромосомах в одном и том же клеточном ядре регулируются по-разному.
- И. Правильно.
- К. Правильно.
- Л. Неправильно. Топологические эффекты, возникающие при расплетании ДНК в одном специфическом сайте, могут ощущаться по всей петле домена, но не по всей хромосоме. Те же механизмы, которые участвуют в активации одной петли, изолируют ее от топологического воздействия соседних доменов.
- М. Правильно.
- Н. Правильно.
- О. Неправильно. Считается, что CG-островки в промоторах генов «домашнего хозяйства» существуют потому, что сайт-специфические белки, связывающиеся с ДНК, защищают их от метилирования в клетках зародышевых линий.

10-16

- А. Клетки *Salmonella* сохраняют подвижность после переключения, потому что в них присутствуют оба гена, кодирующие флагеллин. Независимо от того, какой ген действует в каждой отдельной клетке, флагеллин синтезируется и жгутик образуется. С другой стороны, трансформированные клетки *E. coli* несут лишь один из кодирующих флагеллин генов – ген *H2*. Следовательно, когда ген *H2* включен, клетка подвижна, а когда ген *H2* выключен, клетка не обладает подвижностью.
- Б. Одноцепочечные глазки в гибридизованной ДНК возникают потому, что два участка цепи, образующие этот глазок, некомплементарны (если бы они были комплементарны, они бы спарились). При подобной гибридизации любые перестройки в ДНК должны привести к тому, что некоторые области молекул ДНК будут некомплементарны друг другу (как подробнее описывается в пункте В). Напротив, никакие модификации ДНК, например метилирование, не могут привести к изменениям в спаривании оснований на таком протяженном отрезке ДНК.

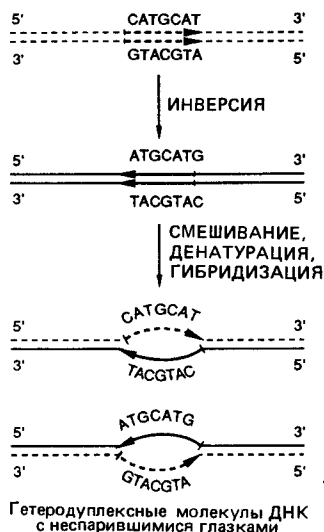


Рис. 10-31. Образование глазка в результате плавления и гибридизации фрагментов ДНК, содержащих инвертированный сегмент ДНК (ответ 10-16). Для того, чтобы легче было проследить за последствиями инверсии, указаны короткие последовательности.

В. С помощью гибридизации можно определить тип перестройки в ДНК, например сайт-специфическую делецию, встраивание или инверсию ДНК. Если происходит делеция или вставка ДНК в определенный сайт, то после гибридизации в области перестройки будет наблюдаться одна одноцепочечная петля, а не два одноцепочечных участка, образующие глазок, показанный на рис. 10-9. Предположим, например, что в одну молекулу ДНК встроен фрагмент. При гибридизации такой молекулы, несущей дополнительный фрагмент, с молекулой, не подвергшейся перестройке, вся ДНК в двух исходных молекулах окажется спаренной, за исключением вставленного фрагмента, который даст одноцепочечную петлю. Делеция в сайте перестройки должна привести к образованию такой же одноцепочечной структуры, как и в случае вставки. (Два типа перестроек можно различить, сравнивая суммарную длину двухцепочечных фрагментов.)

При инверсии фрагмент ДНК переворачивается, и таким образом «верхняя» цепь оказывается «внизу» (рис. 10-31). При гибридизации исходной цепи с цепью, содержащей инверсию, двухцепочечная структура образуется по всей длине молекулы, за исключением области инверсии. В инвертированном сегменте две идентичные цепи, ориентированные противоположным образом, расположены против друг друга. Поскольку цепи идентичны, а не комплементарны, то вместо того, чтобы спариваться, они образуют глазок (рис. 10-31).

Литература: Zieg, J.; Silverman, M.; Hilmen, M., Simon, M. Recombinational switch for gene expression. *Science* 196, 170-172, 1977.

10-17

А. В присутствии α_1 белок α_2 существует в двух формах, различающихся по специфичности связывания. Результаты второго варианта опыта подтверждают такой вывод и исключают возможность того, что α_2 присутствует в одной форме, которая может связываться как с α -специфическими, так и с гаплоид-специфическими последовательностями. При добавлении в избытке немеченой α -специфической ДНК связывания с мечеными α -специфическими последовательностями не происходит, а с мечеными гаплоид-специфическими последовательностями связывание сохраняется. Аналогичным образом добавление в избытке немеченой гаплоид-специфической ДНК препятствует связыванию с мечеными гаплоид-специфическими фрагментами. Если бы одна форма α_2 была способна связываться с обеими регуляторными последовательностями, то при добавлении в избытке любого немеченого фрагмента прекратилось бы связывание обоих типов радиоактивно меченных фрагментов.

Третий вариант опыта показывает, что соотношение активностей связывания для α -специфических и гаплоид-специфических последовательностей варьирует в зависимости от содержания белка α_1 . Если бы репрессор α_2 в диплоидной клетке превратился целиком в α -форму, способную связываться с обоими сайтами, то соотношение не зависело бы от количества белка α_1 .

В. Ваши опыты легче всего объяснить, если предположить, что α_1 действует стехиометрически, изменяя специфичность связывания репрессора α_2 , вероятно, в результате взаимодействия с ним. В эксперименте по связыванию фрагмента, представленном на рис. 10-10, при низком содержании α_1 гаплоид-специфические фрагменты связываются в незначительном количестве; если же α_1

Рис. 10-32. Регуляция экспрессии генов с участием генов типа спаривания у нового штамма дрожжей (ответ 10-18).

ТИП СПАРИВАНИЯ	ХАРАКТЕР ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ		ФЕНОТИП
	ЛОКУС ТИПА СПАРИВАНИЯ	ДРУГИЕ ГЕНЫ	
M	M1 M2 Включен Включен → Не влияет	Msg Fsg Ssg ВКЛЮЧЕН ВКЛЮЧЕН ВЫКЛЮЧЕН	Гаплоидная клетка, M-тип спаривания
F	F1 F2 Включен Включен → Не влияет	Msg Fsg Ssg ВКЛЮЧЕН ВКЛЮЧЕН ВЫКЛЮЧЕН	Гаплоидная клетка, F-тип спаривания
M/F	M1 M2 F1 F2 Включен Включен Включен Включен	Msg Fsg Ssg ВЫКЛЮЧЕН ВЫКЛЮЧЕН ВКЛЮЧЕН	Диплоидная клетка, нет спаривания

присутствует в избытке, то связывание гаплоид-специфических фрагментов происходит довольно активно. Самое простое объяснение воздействия дефектного репрессора α_2 состоит в том, что он связывается с белком α_1 , снижая таким образом возможность связывания белка α_1 с нормальным репрессором α_2 .

Следует отметить, что ни один из этих экспериментов не исключает возможности того, что белок α_1 каталитически воздействует на репрессор α_2 . Однако для того, чтобы объяснить действие белка α_1 его каталитическими свойствами на основе данных, полученных в эксперименте, потребовалось бы сделать некоторые допущения. Поэтому представляется наиболее вероятным, что репрессор в той форме, в какой он связывается с гаплоид-специфическими последовательностями, содержит как белок α_1 , так и репрессор α_2 .

Литература: Goutte, C.; Johnson, A.D. α_1 protein alters the DNA-binding specificity of α_2 repressor. Cell 52, 875-882, 1988.

10-18 На рис. 10-32 представлена схема регуляции, объясняющая поведение мутантов. F-специфические гены остаются включенными до тех пор, пока они не репрессируются продуктом гена *M1*. M-специфические гены остаются включенными до тех пор, пока они не репрессируются продуктом гена *F2*. Гены, специфические для споруляции, выключены, пока они не активируются продуктами как гена *F1*, так и гена *M2*, присутствующими только в диплоидных клетках.

На первый взгляд кажется, что в такой массе мутантов и фенотипов невозможно разобраться. Однако большинство схем, объясняющих экспрессию генов, было получено именно на основании подобных генетических данных. (Лишь потом предсказанные взаимодействия молекул проверяли биохимическими методами и уточняли все подробности.) Среди генетических данных, приведенных в табл. 10-3, имеются три важные подсказки, помогающие построить всю схему регуляции. В том, что касается типа спаривания M, обнаружено следующее. У мутантов *M1*⁻ происходит экспрессия как M-специфических, так и F-специфических генов. Это позволяет предположить, что продукт гена *M1* может быть репрессором F-специфических генов. В клетках, принадлежащих к типу спаривания F, при мутации

$F2^-$ происходит экспрессия как F-специфических, так и M-специфических генов. Следовательно, продукт гена $F2$ может быть репрессором M-специфических генов. И наконец, хотя мутации $M2^-$ и $F1^-$, по-видимому, не оказывают воздействия на гаплоидные клетки, в диплоидных клетках каждая из этих мутаций препятствует экспрессии генов, специфических для споруляции. Это говорит о том, что они могут действовать совместно, активируя гены, специфические для споруляции. Эти три подсказки помогают выявить три типа регуляторных взаимодействий и, таким образом, согласовать между собой все полученные результаты. Для того чтобы считать схему, приведенную на рис. 10-32, целиком доказанной, необходимы дополнительные генетические и биохимические эксперименты.

10-19

- А. Интенсивности полос РНК макси-гена и нормальной 5S-РНК при электрофорезе смеси матриц, не обработанных рестриктазами (дорожки, обозначенные «Без обработки» на рис. 10-11, Б), одинаковы, следовательно, уровень метилирования гена 5S-РНК не влияет на его транскрипционную активность.
- Б. Результаты транскрипции после обработки матриц рестриктазами такие, как вы и ожидали. Транскрипция с целиком метилированного макси-гена 5S-РНК специфически подавляется после обработки рестриктазой DpnI, которая расщепляет лишь полностью метилированные сайты рестрикции. Обработка MboI специфически подавляет транскрипцию неметилированных генов 5S-РНК, а обработка рестриктазой Sau3A, которая нечувствительна к уровню метилирования сайта рестрикции, вызывает подавление транскрипции всех генов 5S-РНК.
- В. Характер транскрипции после репликации и расщепления свидетельствует о том, что транскрипционные комплексы в ходе репликации не остаются связанными с макси-геном 5S-РНК. Если бы реплицированные молекулы оставались в активном транскрипционном комплексе, то транскрипционная активность должна была бы выявиться после обработки рестриктазой DpnI, которая не расщепляет реплицированные молекулы. Активность, остающаяся после обработки MboI, определяется полностью метилированными молекулами ДНК, которые не реплицировались. Если бы транскрипционные комплексы не удалялись при репликации, то активность сохранялась бы и после обработки DpnI.
- Г. Если бы всего 50% молекул образовывали активные транскрипционные комплексы, то распределение полос не должно было бы измениться (уменьшилась бы только их интенсивность). Однако в этом случае вы не смогли бы сделать вывода о том, что при репликации происходит удаление транскрипционных комплексов. Если бы только 50% молекул образовывали комплексы и только 50% молекул реплицировались, то скептик (каким и должен быть настоящий ученый) мог бы предположить, что сборка транскрипционного комплекса подавляет репликацию и реплицируются только те молекулы, которые не образуют комплексов. Таким образом, в подобном эксперименте невозможно было бы проверить то, что задумано. Суть возражений станет понятнее, если вы представите, что 10% молекул образовали транскрипционные комплексы и 10% реплицировались. Для того, чтобы ваши выводы оказались правомочными, важно доказать, что молекулы, несущие транскрипционные комплексы, реплицирова-

лись. Хотя можно попытаться каким-либо образом специфически определить репликацию в транскрипционных комплексах, однако самый простой способ — это показать, что фракция реплицирующихся молекул значительно больше, чем фракция молекул, не входящих в транскрипционные комплексы.

Литература: *Wolffe, A. P.; Brown, D. D.* DNA replication in vitro erases a *Xenopus* 5S RNA gene transcription complex. *Cell* 47, 217-227, 1986.

10-20

- А. Сохранение метилированных последовательностей CG зависит от поддерживающей метилазы, которая обычно присутствует в клетках млекопитающих. Эта метилаза превращает наполовину метилированную ДНК (в которой CG метилированы лишь в одной цепи) в полностью метилированную ДНК (метилированную по комплементарным CG в другой цепи). Такое превращение должно осуществляться после каждого цикла репликации, чтобы поддерживался уровень метилирования ДНК. Конструкции, введенные в клетки, напоминали нормальную, наполовину метилированную ДНК, возникающую при репликации. В соответствии с этим поддерживающая метилаза превращала наполовину метилированные сайты CG в полностью метилированные и затем поддерживала их в метилированном состоянии.

Метилированные цитозиновые нуклеотиды, не входящие в состав последовательностей CG, не являются субстратом для поддерживающей метилазы. Следовательно, при каждом цикле репликации их число снижалось вдвое; таким образом, когда клетки собирали для анализа, концентрация метилированных цитозиновых нуклеотидов, не входящих в состав последовательностей CG, была уже так низка, что они не могли быть обнаружены.

- Б. Рестрикционные фрагменты, образующиеся при обработке HindIII и чувствительными к метилированию рестриктазами CfoI и HpaII, получают именно такими, какие можно было ожидать, исходя из расположения метильных групп во введенных конструкциях. Поскольку рестрикты размерами менее 1 т.п.н. не определяли, то фактически в этих экспериментах анализировали только четыре чувствительных к метилированию сайта рестрикции: оба сайта HpaII и два сайта CfoI, окружающие центральный сайт HpaII. Если во введенной конструкции один из этих сайтов не был метилирован, то он оказывался чувствительным к разрезанию в составе клеточной ДНК. Если во введенной конструкции один из этих сайтов был метилирован, то он не был чувствителен к разрезанию в составе клеточной ДНК.

Весьма важно не упускать из вида, что в нормальном гене γ -глобина имеется 27 последовательностей CG. В приведенных экспериментах лишь четыре из них были проанализированы путем обработки чувствительными к метилированию рестриктазами. Поскольку большинство последовательностей CG не являются частью сайтов узнавания для чувствительных к метилированию рестриктаз, то для того, чтобы определить, сохраняются ли эти последовательности, необходимо провести иные эксперименты.

- В. Эти результаты убедительно показывают, что один ключевой сайт метилирования не может быть ответственным за то, будет ген экспрессирован или нет. Если бы такой единственный сайт существовал, то разница между транскрипционной активностью конструкций В (0%) и С (100%) свидетельствовала бы о том, что

сайт расположен в области, которая не метилирована в конструкции С и метилирована в конструкции В, т. е. в одной из пяти последовательностей CG (с 12-й по 16-ю), представленных в увеличенном на рис. 10-12, В участке вокруг точки начала транскрипции. Однако ни конструкция D, ни конструкция Е не образуют транскрипта γ -глобина. Поскольку в конструкции D не метилированы сайты 14, 15 и 16, а в конструкции Е не метилированы сайты 12 и 13, то *один* неметилированный сайт не может быть единственным фактором, определяющим экспрессию гена γ -глобина. Авторы этих экспериментов склоняются к мысли, что для достижения максимальной экспрессии гена достаточно большой участок (больше того, который есть в конструкции Г) вокруг промотора не должен содержать сайты метилирования.

Литература: Murray, E. J.; Grosfeld, F. Site-specific demethylation in the promoter of human γ -globin does not alleviate methylation mediated suppression. EMBO J. 6, 2329–2335, 1987.

Посттранскрипционный контроль

10-21

- А. аттенуация транскрипции
- Б. альтернативный сплайсинг РНК
- В. изоформы белка
- Г. ген
- Д. негативный; трансляция
- Е. позитивный; трансляция
- Ж. сдвиг рамки трансляции
- З. редактирование РНК

10-22

- А. Неправильно. У прокариот в аттенуации транскрипции участвуют связанные рибосомы. У эукариот же в ядре нет функциональных рибосом. Следовательно, у эукариот в аттенуации транскрипции, вероятнее всего, участвуют регуляторные молекулы, которые связываются со специфической последовательностью РНК.
- Б. Правильно.
- В. Правильно.
- Г. Неправильно. При сплайсинге РНК могут образоваться такие мРНК, в которых последовательность, кодирующая карбоксильный конец исходного белка, полностью отсутствует и замещена другой последовательностью.
- Д. Правильно.
- Е. Неправильно. Железо связывается с белком-регулятором, а не с чувствительным к железу элементом в мРНК ферритина. В отсутствие железа белок-регулятор связывается с этим элементом в мРНК, что препятствует ее трансляции. В присутствии железа белок-регулятор связывается с ним, отделяясь от молекулы мРНК ферритина, которая после этого транслируется. Подобный механизм позволяет в ответ на увеличение содержания железа синтезировать больше молекул ферритина.
- Ж. Правильно.
- З. Правильно.
- И. Неправильно. Стабильность мРНК трансферринового рецептора и способность мРНК ферритина транслироваться регулируются одним и тем же РНК-связывающим белком, чувствительным

к железу, однако результаты этого связывания для двух мРНК оказываются различными. Связывание с чувствительным к железу элементом, локализованным у 5'-конца мРНК ферритина, приводит к остановке трансляции и снижению уровня ферритина. С другой стороны, при связывании с чувствительным к железу элементом, расположенным на 3'-конце мРНК трансферринового рецептора, мРНК стабилизируется, в результате чего может образоваться больше молекул трансферринового рецептора.

К. Правильно.

Л. Правильно.

10-23

А. Поскольку мРНК кальцитонина образуется в том случае, когда клетки трансфицированы геном дикого типа, а мРНК CGRP синтезируется, когда они трансфицированы геном, содержащим мутацию по сайту сплайсинга экзона 4, то в лимфоцитах должны содержаться все факторы процессинга, необходимые для получения мРНК обоих типов.

Б. Если экспрессия мРНК кальцитонина в линии клеток лимфоцитов зависит от отбора сайта полиаденилирования, то мутант, у которого отсутствует такой сайт в экзоне 4, должен был образовывать мРНК CGRP. Действительно, если сплайсингу экзона 3 с экзonom 5 (он необходим для образования мРНК CGRP) препятствует использование сайта полиаденилирования в экзоне 4, то при удалении этого сайта должна образовываться мРНК CGRP.

Напротив, мутантный ген, в котором отсутствует сайт сплайсинга экзона 4, подвергался бы полиаденилированию преимущественно в экзоне 4, что должно препятствовать образованию мРНК CGRP. (Как будет объяснено в пункте Г, хотя мРНК CGRP и не образуется на гене, мутантном по сайту сплайсинга экзона 4, однако структура продуцируемой в этом случае aberrантной мРНК не соответствует такому простому механизму.)

В. Если экспрессия мРНК кальцитонина в линии клеток лимфоцитов зависит от отбора сайтов сплайсинга в экзоне 4, то следует ожидать, что мутант, у которого существует этот сайт, будет образовывать мРНК CGRP. Если в лимфоцитах происходит преимущественно сплайсинг экзона 3 и экзона 4, то удаление сайта сплайсинга в экзоне 4 должно способствовать использованию сайта сплайсинга на экзоне 5 и таким образом приводить к образованию мРНК CGRP.

Напротив, мутант, у которого в экзоне 4 отсутствует сайт полиаденилирования, может, по-видимому, преимущественно соединять экзон 3 с экзonom 4 и в результате образовывать aberrантную РНК, содержащую четвертый интрон наряду с экзонами 5 и 6. (Как будет показано в пункте Г, хотя aberrантная РНК и образуется, но не такая, какую следовало бы ожидать исходя из этих простых соображений.)

Г. Результаты, полученные для этих двух мутантов, лучше всего можно объяснить отбором сайта сплайсинга. Как объяснялось в пунктах Б и В, гипотеза отбора сайтов сплайсинга правильно объясняет тот факт, что мутант, у которого отсутствует сайт сплайсинга в экзоне 4, образует мРНК CGRP. И напротив, предположение об отборе сайтов полиаденилирования неправильно предсказывает, что мРНК CGRP будет образовываться у мутанта, лишенного сайта полиаденилирования в экзоне 4. Следовательно, эти результаты свидетельствуют в пользу гипотезы об отборе сайтов сплайсинга, ибо она хорошо объясняет

способность линии клеток лимфоцитов образовывать мРНК кальцитонина вместо мРНК CGRP.

Однако ни по одной из этих простых моделей нельзя предсказать структуру aberrантной РНК, образующейся в том случае, если линию клеток лимфоцитов трансфицировать мутантом, дефектным по сайту полиаденилирования в экзоне 4. В aberrантной РНК сохраняется как третий, так и четвертый интроны, даже если в экзоне 3 присутствует 5'-сайт сплайсинга, а в экзонах 4 и 5 – 3'-сайты сплайсинга. Ни одна из простых моделей альтернативного процессинга не предсказывает подобного результата. В связи с этим полагают, что альтернативный процессинг транскрипта кальцитонина/CGRP идет по более сложному пути отбора сайтов сплайсинга, детали которого еще неясны.

Литература: *Leff, S. E.; Evans, R. M.; Rosenfeld, M. G.* Splice commitment dictates neuron-specific alternative RNA processing in calcitonin/CGRP gene expression. *Cell* 48, 517–524, 1987.

10-24

А. Сколько процентов составляет синтез ферритина от суммарного синтеза белка для каждого образца можно определить, разделив показатель синтеза ферритина на показатель синтеза суммарного белка клетки. Для первого препарата эти цифры составляют $700/750\,000 = 0,093\%$. Все остальные данные приведены в табл. 10-6.

Таблица 10-6. Синтез ферритина у крысы после различных вариантов воздействия (ответ 10-24)

Добавка	Актиномицин D	Фракция	Суммарный синтез	Синтез ферритина	Доля ферритина	Приведенный ферритин	Распределение ферритина
Физиологический раствор	Отсутствует	Полисомы	750 000	700	0,093	0,079	49%
		Супернатант	255 000	1400	0,549	0,082	51%
						0,161	
Железо	Отсутствует	Полисомы	500 000	900	0,180	0,153	89%
		Супернатант	400 000	500	0,125	0,019	11%
						0,172	
Физиологический раствор	Присутствует	Полисомы	800 000	800	0,100	0,085	53%
		Супернатант	600 000	3000	0,500	0,075	47%
						0,160	
Железо	Присутствует	Полисомы	780 000	1380	0,177	0,150	89%
		Супернатант	550 000	700	0,127	0,019	11%
						0,169	

Чтобы определить распределение мРНК ферритина между фракцией полисом и супернатантом, необходимо вычислить уровень синтеза ферритина в каждом препарате исходя из распределения суммарной мРНК между фракцией полисом и супернатантом. Для этого следует умножить долю синтеза ферритина во фракции полисом на 0,85, а долю синтеза его в супернатанте – на 0,15. Эти значения приведены в табл. 10-6 в столбце «Приведенный ферритин». Доля суммарной мРНК ферритина во фракции полисом равна частному от деления значения в столбце «Приведенный ферритин» на сумму значений в столбце «Приведенный ферритин». Для первого препарата она равна

0,079/0,161 = 49%. Остальные значения приведены в последнем столбце табл. 10-6.

- Б. Две особенности приведенных данных со всей очевидностью указывают на то, что скорость транскрипции мРНК ферритина не зависит от количества железа. Во-первых, добавление железа не приводит к увеличению содержания мРНК ферритина. Как показывают данные в столбце «Приведенный ферритин», общее количество мРНК ферритина после добавления физиологического раствора или железа практически одно и то же. Во-вторых, ингибитор синтеза РНК — актиномицин D — не влияет на содержание суммарной мРНК ферритина. Если бы повышение синтеза ферритина, индуцированное добавлением железа, происходило вследствие увеличения содержания мРНК ферритина, то повышение уровня синтеза мРНК было бы значительным и блокировалось бы актиномицином D.
- В. В основном влияние железа состоит в изменении распределения мРНК ферритина между фракцией полисом и супернатантом. В отсутствие железа около 50% мРНК ферритина не связано с полисомами. В присутствии железа около 90% мРНК ферритина находится во фракции полисом. Следовательно, в присутствии железа фракция мРНК ферритина, связанная с полисомами, увеличивается примерно в два раза. Такой переход от свободной мРНК к мРНК, связанной с полисомами, хорошо объясняет двукратное возрастание синтеза ферритина в присутствии железа, поскольку белок транслируется лишь с мРНК, связанной с полисомами.

Молекулярный механизм, препятствующий связыванию мРНК ферритина с рибосомами и ее переходу во фракцию полисом, еще неясен. Гены ферритина крысы, человека, курицы и лягушки содержат высококонсервативную последовательность протяженностью 28 нуклеотидов (элемент, определяющий реакцию на железо), расположенную на 5'-конце этих генов и необходимую для того, чтобы ген мог регулироваться железом. По-видимому, белок-регулятор, чувствительный к железу, связывается с этими областями мРНК ферритина и мешает посадке рибосом. В присутствии железа мРНК ферритина освобождается и связывается с рибосомами, вследствие чего уровень синтеза ферритина повышается. Поскольку белок-регулятор не связывается с мРНК ферритина, эта мРНК может транслироваться.

Литература: Zahring, J.; Baliga, B.S.; Munro, H.N. Novel mechanism for translational control in regulation of ferritin synthesis by iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, 857–861, 1976.

Liebold, E.A.; Munro, H.N. Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved sequence in the 5' untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2171–2175, 1988.

10-25

- А. Концентрация рибосом в лизате ретикулоцитов равна $2,5 \times 10^{-7}$ М, а концентрация HCR, которая полностью блокирует синтез белка, составляет $5,6 \times 10^{-9}$ М.

$$[\text{Рибосомы}] = \frac{1 \text{ мг}}{\text{мл}} \times \frac{1000 \text{ мл}}{\text{л}} \cdot \frac{\text{моль}}{4 \cdot 10^6 \text{ г}} \times$$

$$\times \frac{1 \text{ г}}{10^3 \text{ мг}}, [\text{Рибосомы}] = 2,5 \times 10^{-7} \text{ М},$$

$$[\text{HCR}] = \frac{1 \text{ мкг}}{\text{мл}} \times \frac{1000 \text{ мл}}{\text{л}} \times \frac{\text{моль}}{180\,000 \text{ г}} \times \frac{1 \text{ г}}{10^6 \text{ мкг}},$$

$$[\text{HCR}] = 5,6 \times 10^{-9} \text{ М.}$$

Таким образом, при полной остановке синтеза белка соотношение молекул HCR и рибосом равно $1:45$ ($2,5 \times 10^{-7} / 5,6 \times 10^{-9} = 45$). Поскольку на глобиновую мРНК приходится в среднем 4 рибосомы, соотношение молекул HCR и глобиновой мРНК составляет примерно $1:10$.

- Б. Соотношение между числом молекул HCR, с одной стороны, и количеством рибосом и молекул глобиновой мРНК, с другой стороны, не свидетельствует о том, что HCR подавляет синтез белка, связываясь стехиометрически с каждым из этих компонентов. Однако исходя только из этого соотношения нельзя исключить возможность того, что HCR стехиометрически инактивирует некоторые другие факторы, необходимые для синтеза белка, содержание которых в десятки раз ниже содержания глобиновой мРНК.

В настоящее время известно, что HCR представляет собой протеинкиназу, которая инактивирует синтез белка по каталитическому пути. HCR фосфорилирует фактор инициации eIF-2.

Литература: Farrell, P. J.; Balkow, K.; Hunt, T.; Jackson, R. J.; Trachsel, H. Phosphorylation of initiation factor eIF-2 and the control of reticulocyte protein synthesis. Cell 11, 187–200, 1977.

10-26

Результаты, полученные на 12 мутантах, свидетельствуют о том, что в регуляторном взаимодействии участвует новосинтезированный белок, а не РНК. Единственные мутанты, у которых наблюдается ответ дикого типа на повышение содержания внутри клетки свободных димеров тубулина, это те, у которых сохранились нуклеотиды, кодирующие аргинин (R) и глутаминовую кислоту (E). Крайне маловероятно, чтобы на взаимодействии с мРНК не сказывались именно те изменения, которые не затрагивали последовательность аминокислот.

Хотя четко установлено, что критическим элементом в саморегуляции синтеза тубулина являются аминокислоты на N-конце белка, однако механизм, посредством которого узнавание этого элемента ведет к изменению стабильности мРНК, неясен.

Литература: Gay, D. A.; Yen, T. J.; Lau, J. T. Y.; Cleveland, D. W. Sequences that confer β -tubulin autoregulation through modulated mRNA stability reside within exon 1 of a β -tubulin mRNA. Cell 50, 671–679, 1987.

Yen, T. J.; Machlin, P. S.; Cleveland, D. W. Autoregulated instability of β -tubulin mRNAs by recognition of the nascent amino terminus of β -tubulin. Nature 334, 580–585, 1988.

10-27

- А. мРНК гибридного гена *fos*-глобин-*fos*, содержащая 3'-конец гена *c-fos*, обладает такой же стабильностью, как и мРНК нормального гена *c-fos* (рис. 10-18, А и В). Напротив, гибридный ген *fos*-глобин, содержащий такую же последовательность на 5'-конце, как и ген *fos*-глобин-*fos*, но не имеющий 3'-концевых последовательностей гена *fos*, весьма стабилен (рис. 10-18, Б). Таким образом, 3'-конец гена *c-fos* человека сообщает мРНК *c-fos* нестабильность. Элемент, определяющий нестабильность, почти наверняка должен оставаться в составе мРНК, чтобы она могла быстро распадаться. Следовательно, этот элемент, вероятно, расположен в 3'-экзоне гена *c-fos*, а не в 3'-фланкирующих последовательностях.

Б. Хотя это и не очевидно с первого взгляда, свойства мРНК гибридного гена *fos*-глобина определяются ее стабильностью. Если мРНК *fos*-глобина очень стабильна, как обычная глобиновая мРНК, то достаточно и такого низкого уровня транскрипции, какой есть в отсутствие сыворотки, чтобы мРНК накопилась в значительных количествах за 24 ч до добавления сыворотки и до первого определения. Если содержание мРНК *fos*-глобина исходно высокое, то временное резкое повышение уровня транскрипции, которое происходит вслед за добавлением сыворотки, не приведет к заметному увеличению общего содержания мРНК *fos*-глобина. Следовательно, повышение стабильности мРНК гибридного гена *fos*-глобин можно объяснить как высоким исходным содержанием этой мРНК, так и отсутствием индукции на гибридном гене *fos*-глобин.

Приведенные результаты показывают, насколько необходима нестабильность молекул, когда система должна быстро реагировать на изменения. Это условие всем хорошо знакомо из повседневной жизни. Например, если изображение на телеэкране задерживается более чем на долю секунды, то движущиеся предметы начинают двоиться. Аналогичным образом эхо мешает воспринимать речь и музыку. Биологические сигнальные реакции включают механизмы, возвращающие систему в исходное положение: старые сигналы постоянно удаляются, чтобы не создавать помех для восприятия новых сигналов.

Литература: Treisman, R. Transient accumulation of *c-fos* RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and *c-fos* 3' sequences. Cell 42, 889–902, 1985.

Wilson, T.; Treisman, R. Removal of poly(A) and consequent degradation of *c-fos* mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences. Nature 336, 396–399, 1988.

10-28 Эти данные свидетельствуют о том, что тканеспецифический синтез аро-B100 в клетках печени и аро-B48 в клетках кишечника происходит за счет различия в процессинге данного транскрипта РНК. Результаты гибридизации, приведенные в табл. 10-5, показывают, что в печени и в кишечнике транскрибируется одна и та же последовательность ДНК. Таким образом, разница между печенью и кишечником не может объясняться тем, что в них действуют разные гены, которые регулируются на уровне транскрипции. Поскольку мРНК аро-B в кишечнике содержит терминирующий кодон в том сайте, где мРНК аро-B печени содержит кодон глутамина, то обе мРНК не могут кодировать один и тот же белок. Следовательно, различия между аро-B48 и аро-B100 не могут объясняться тканеспецифическим расщеплением белка.

Идентичность последовательностей ДНК, транскрибируемых в печени и в кишечнике, и различие в последовательностях мРНК аро-B из тех же тканей свидетельствуют о том, что в одной ткани должна произойти замена определенного нуклеотида в ходе экспрессии гена аро-B. Результаты, приведенные в табл. 10-5, показывают, что последовательности, комплементарные олигонуклеотиду с терминирующим кодоном (олиго-STOP), присутствуют лишь в РНК кишечника. Следовательно, нуклеотид специфически заменяется в транскрипте в клетках кишечника. Каким образом происходят подобные поразительные изменения, остается неясным.

Литература: Powell, L. M.; et al. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. Cell 50, 831–840, 1987.

Организация и эволюция ядерного генома

10-29

- А. сателлитные ДНК
- Б. транспозирующиеся (подвижные) элементы, или транспозоны
- В. транспозиционный взрыв
- Г. подвижный элемент L1, *Alu*-последовательность

10-30

- А. Правильно.
- Б. Неправильно. Последовательности тандемно повторенных генов как и спейсерной ДНК, расположенной между ними, гомогенизируются в результате неравного кроссинговера и конверсии генов.
- В. Правильно.
- Г. Правильно.
- Д. Неправильно. Полагают, что прерывистые гены имеют весьма древнее происхождение. Считается, что бактерии потеряли свои интроны — после того, как в процессе эволюции возникла большая часть их белков, — реагируя на мощное давление отбора увеличением скорости размножения и достигая максимальной скорости, возможной при данном содержании питательных веществ в окружающей среде.
- Е. Правильно.
- Ж. Неправильно. Хотя большинство подвижных элементов перемещаются редко, но этих элементов в геноме так много, что их передвижение оказывает значительное влияние на вариабельность видов. Например, более половины спонтанных мутаций у дрозофил происходит вследствие встраивания транспозона в мутантный ген или непосредственно рядом с ним.
- З. Правильно.
- И. Правильно.
- К. Неправильно. *Alu*-последовательности транскрибируются РНК-полимеразой III. Поскольку промоторы РНК-полимеразы III находятся внутри транскрипта, то *Alu*-последовательность сама несет информацию, необходимую для ее транскрипции, куда бы она ни перемещалась.

10-31 При разделении продуктов рестрикции ДНК плода, унаследовавшего семейное заболевание, будут обнаружены полосы рестриктов с размерами 1, 2 и 9 т. п. н.

Затруднения при идентификации полос этих рестриктов возникают вследствие того, что каждый человек является диплоидным организмом и, следовательно, несет две копии генетического локуса. Проще всего начать определение полос для отдельных хромосом путем выявления индивидов, гомозиготных по одной из полос. Гомозиготные индивиды могут быть выявлены по двум критериям: полосы рестриктов одинаковы по интенсивности и сумма длин фрагментов, входящих в состав этих полос, равна 12 т. п. н. (размер анализируемой области, рис. 10-20). Согласно этим критериям, бабушка по материнской линии и дедушка по отцовской линии гомозиготны. Они неизбежно должны передать одну хромосому со своими признаками потомкам. Следовательно, мать должна иметь одну хромосому, рестрикция которой даст такие же полосы, как и у ее матери, а у отца полосы после рестрикции одной из хромосом будут идентичны полосам для

хромосомы его отца. Зная полосы для одной хромосомы, проще определить полосы, получающиеся в результате расщепления другой.

В изучаемой вами генеалогии имеются три различных типа расщепления: тип I характеризуется положительным результатом по сайтам A, B и C, вследствие чего образуются полосы 1, 2, 4 и 5 т.п.н.; тип II характеризуется положительным результатом по сайтам A и C, но отрицательным по сайту B, вследствие чего возникают полосы 1, 5 и 6 т.п.н.; тип III характеризуется положительным результатом по сайтам A и B, но отрицательным по сайту C, вследствие чего образуются полосы 1, 2 и 9 т.п.н. Поскольку тип I — у дедушки со стороны отца, похоже, что ни один из этих типов не связан с наследственным заболеванием. Отец гетерозиготен по типам I и III, а мать гетерозиготна по типам II и III. Здоровый ребенок гетерозиготен по типам I и II. Среди живых членов семьи не представлена лишь гомозигота по типу III. Тип III, кроме того, присутствует у бабушки со стороны отца, чей брат страдал этим заболеванием. Если суммировать все данные, то скорее всего с заболеванием связан именно тип III (полосы, 1, 2 и 9 т.п.н.).

10-32

- А. Результаты, полученные при обработке различными рестриктазами, указывают на то, что гены U2 в геноме человека tandemно повторены подобно тому, как расположены две копии этого гена в клоне бактериофага λ . Такие рестриктазы, как HindIII, HincII и KpnI, разрезающие один раз внутри повтора размером 6 т.п.н., разделяют весь кластер на фрагменты по 6 т.п.н. Обработка такими рестриктазами, как EcoRI, BglII и XbaI, сайтов узнавания которых нет внутри повтора размером 6 т.п.н., приводит к тому, что весь этот кластер остается в одном фрагменте. Неполное расщепление рестриктазой HindIII приводит к появлению лесенки полос, образуемых фрагментами с размерами, кратными 6 т.п.н.
- Б. ДНК бактериофага λ после рестрикции дает две полосы, поскольку KpnI расщепляет клонированную ДНК в двух местах, в результате чего образуется один фрагмент размером 6 т.п.н., содержащий один ген U2, и больший по размеру фрагмент (с правой стороны от клона на рис. 10-21), который также несет одну копию гена U2. Дробление любого tandemного повтора приведет к образованию так называемых соединяющих фрагментов из концов областей повторов. В этих экспериментах виден лишь один из соединяющих фрагментов, так как ген U2 используется в качестве зонда. При анализе продуктов рестрикции всего генома соединяющий фрагмент не виден, так как его слишком мало — на один соединяющий фрагмент приходится много внутренних фрагментов. Выявлению соединяющего фрагмента может способствовать более длительная экспозиция радиоавтографа.
- В. Поскольку интенсивность полосы, образованной фрагментами размером 6 т.п.н., при анализе 2 нг клонированной ДНК такая же, как интенсивность полосы, получающейся при нанесении 10 мкг геномной ДНК, то можно составить простую пропорцию: 2 нг клонированной ДНК, которая на 43 т.п.н. содержит 1 гибридизующийся ген U2, эквивалентны 10 мкг геномной ДНК, несущей неизвестное (n) число генов U2 на 3×10^6 т.п.н. (Хотя в клонированной ДНК содержится два гена U2, но лишь один из

них участвует в гибридизации с фрагментами размером 6 т. п. н.)

$$\frac{1 \text{ ген U2}}{43 \text{ т. п. н.}} \times 2 \text{ нг} = \frac{n \text{ генов U2}}{3 \times 10^6 \text{ т. п. н.}} \times 10\,000 \text{ нг},$$

$$n = \frac{3 \times 10^6 \text{ т. п. н.}}{43 \text{ т. п. н.}} \times \frac{2 \text{ нг}}{10\,000 \text{ нг}},$$

$$n = 14.$$

Таким образом, в геноме человека содержится около 15 генов U2 (принимая во внимание один ген U2 в невидимом соединяющем фрагменте).

Литература: van Arsdell, S.W.; Weiner, A.M. Human genes for U2 small nuclear RNA are tandemly repeated. *Mol. Cell. Biol.* 4, 492–499, 1984.

10-33

- А. В случае обработки RsaI вариант ПДРФ, характерный для гена А-типа, отсутствует у мужчин, не отличающих зеленый цвет, а вариант ПДРФ, характерный для гена В-типа, отсутствует у мужчин, не отличающих красный цвет (рис. 10-24). Следовательно, ген А-типа кодирует зеленый зрительный пигмент, а ген В-типа кодирует красный зрительный пигмент.
- Б. Гены красного и зеленого зрительных пигментов физически сцеплены, так как они присутствуют на одном фрагменте NotI (рис. 10-25). Поскольку зонд, комплементарный обоим генам, гибридизуется только с одним фрагментом NotI даже у индивидов с различным числом генов А- и В-типа, то гены должны быть расположены на одном и том же фрагменте.
- В. Ген В-типа (красный пигмент) расположен на 5'-конце кластера, а ген А-типа (зеленый пигмент) на его 3'-конце. Как показано на рис. 10-33, SfiI-фрагмент, разрезаемый NotI, может содержать последовательность, комплементарную зонду, лишь в том случае, если ген В-типа расположен на 5'-конце кластера.
- Г. Присутствие весьма сходных (идентичных на 98%) генов вблизи этого участка позволяет предположить, что варибельность среди мужчин с нормальным цветовым зрением возникает скорее всего вследствие гомологичной рекомбинации (неравный кроссинговер) между тандемно повторенными генами. В пользу этого предположения свидетельствует и то, что у индивидов с увеличенным числом этих генов наблюдается одинаковое приращение (на 39 т. п. н.) размеров фрагмента NotI (рис. 10-25). Другими словами, фрагменты NotI у мужчин с 2 генами (105 т. п. н. у индивида 1)

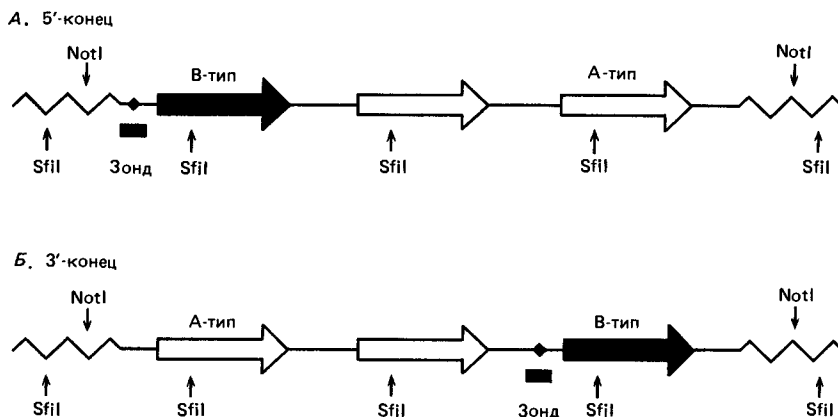
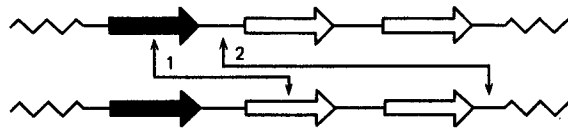


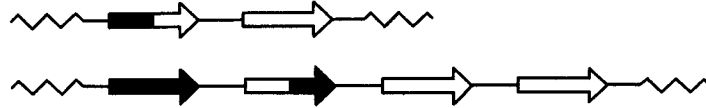
Рис. 10-33. Определение гена, находящегося на 5'-конце кластера генов (ответ 10-33). А. Ген В-типа на 5'-конце. Б. Ген В-типа на 3'-конце.

Рис. 10-34. Неравный кроссинговер, в результате которого происходит делеция гена или образуется гибридный ген (ответ 10-33). Рекомбинация по гомологичным сайтам, указанным стрелкой 1 (А), приводит к образованию гибридных генов (Б). Рекомбинация по гомологичным сайтам, указанным стрелкой 2, приводит к делеции генов в одной хромосоме и добавлению их к другой (В).

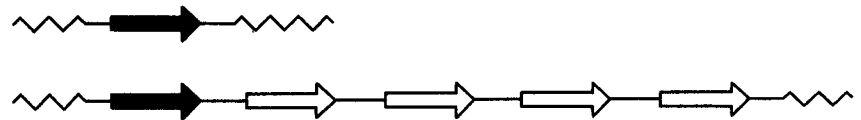
А. НЕРАВНЫЙ КРОССИНГОВЕР МЕЖДУ ГЕНАМИ, КОДИРУЮЩИМИ ЗРИТЕЛЬНЫЕ ПИГМЕНТЫ



Б. ПРОДУКТЫ РЕКОМБИНАЦИИ ПО САЙТАМ, УКАЗАННЫМ СТРЕЛКОЙ 1



В. ПРОДУКТЫ РЕКОМБИНАЦИИ ПО САЙТАМ, УКАЗАННЫМ СТРЕЛКОЙ 2



отличаются от размеров фрагмента NotI у мужчин с 3 генами (144 т. п. н. у индивида 3) на 39 т. п. н.

Если неравный кроссинговер между этими генами происходит часто, на что указывает вариабельность генов, наблюдаемая среди мужчин с нормальным цветовым зрением, тогда дальтонизм может возникать в результате этого же процесса. Неравный кроссинговер может приводить к элиминации гена путем делеции либо к изменению функции при образовании гибридного гена (рис. 10-34). Веским аргументом в пользу этого предположения служит тот факт, что отличие генов мужчин-дальтоников, исследованных с помощью рестриктазы NotI (рис. 10-25, индивиды 7, 12 и 14), от генов нормальных мужчин, состоящее в приращении NotI-фрагмента (39 т. п. н.), точно соответствует такому различию среди нормальных мужчин. Простейшее объяснение подобного приращения в размерах фрагмента — это неравный кроссинговер внутри семейства tandemно повторенных генов.

Литература: Nathans, J.; Thomas, D.; Hogness, D. S. Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green and red pigments. *Science* 232, 193–202, 1986.

Nathans, J.; Piantanida, T. P.; Eddy, R. L.; Shows, T. B.; Hogness, D. S. Molecular genetics of inherited variation in human color vision. *Science* 232, 203–210, 1986.

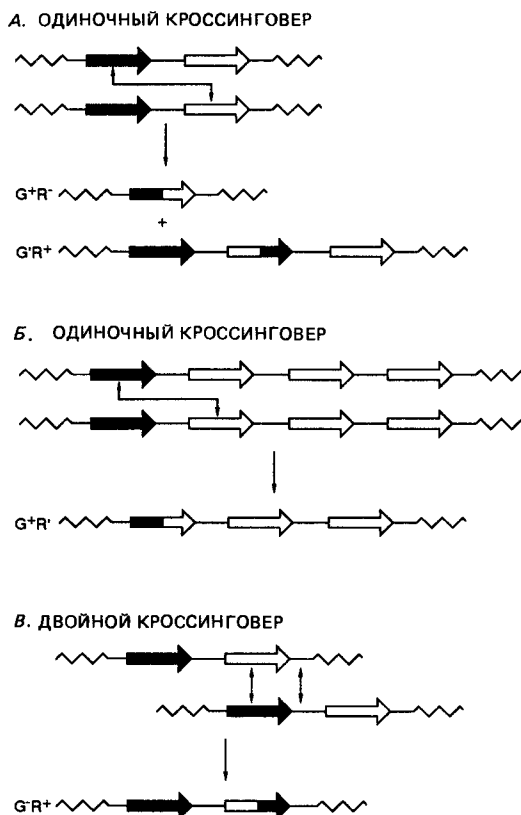
Vollrath, D.; Nathans, J.; Davis, R. W. Tandem array of human visual pigment genes at Xq28. *Science* 240, 1669–1671, 1988.

10-34

- А. Схема рекомбинации, в результате которой возникают мутантные гены, определяющие появление дихроматов и аномальных трихроматов, представлена на рис. 10-35. Такая рекомбинация не является чем-то уникальным, подобные события часто происходят между различными последовательностями хромосом. Тем не менее на этом примере можно проиллюстрировать принципы неравного кроссинговера.

(Поскольку эти гены сцеплены с полом, рекомбинация между

Рис. 10-35. Этапы неравной рекомбинации с образованием генных структур, определяющих появление дихроматов и аномальных трихроматов (ответ 10-34).



разными последовательностями хромосом должна происходить только у женщин. Рекомбинация между идентичными последовательностями может также происходить между сестринскими хроматидами у мужчин. Чтобы осуществилась передача потомству, каждое из этих событий должно происходить в клетках зародышевого пути.)

Требуется отдельного комментария рекомбинация, в результате которой нарушается восприятие зеленого цвета (дихроматы G^-R^+). Она может произойти в результате двух неравных кроссинговеров либо вследствие конверсии генов. Любое из этих событий, которые неразличимы по конечному результату, приводит к замещению участка в одной молекуле ДНК гомологичным участком из другой молекулы ДНК.

- Б. Элементы, участвующие в регуляции транскрипции при экспрессии гена, обычно расположены в области 5'-концов генов. Таким образом, если экспрессия этих генов контролируется на уровне инициации транскрипции, что, вероятно, и имеет место в данном случае, то вполне можно ожидать, что гибридные гены, как и нормальные, должны экспрессироваться в соответствии с тем, какая последовательность расположена на их 5'-концах. Следовательно, гибридные гены у дихроматов, не воспринимающих красного цвета (G^+R^-), и аномальных по красному цвету трихроматов (G^+R^+), вероятно, экспрессируются, как гены красного пигмента, так как их 5'-концы относятся к генам красного пигмента. Аналогичным образом у дихроматов, не воспринимающих зеленого цвета (G^-R^+), и у аномальных по зеленому цвету трихроматов (G^-R^+) гибридные гены экспрессируются как ген зеленого пигмента, поскольку содержат 5'-концы.**

В. Единственный ген, присутствующий у дихроматов, не воспринимающих красного цвета (G^+R^-), должен определять такую же спектральную чувствительность, как ген зеленого пигмента, даже если он содержит лишь часть гена зеленого пигмента. (Результаты изучения многих мужчин-дальтоников подтверждают предположение, что 3'-часть гена пигмента кодирует домен, ответственный за способность пигмента поглощать свет.) Если единственный гибридный ген кодирует «зеленый» пигмент, то можно ожидать, что мужчина, несущий такой ген, окажется дальтоником, не воспринимающим красного цвета. Интересно, что, по-видимому, «зеленый» пигмент экспрессируется в клетках, которые в норме должны были бы стать красными колбочками, так как у гибридного гена 5'-конец тот же, что и у гена красного пигмента. Клетки, которые в норме должны были бы стать зелеными колбочками, могут совсем не содержать пигмента, так как в них нет гена, 5'-конец которого был бы таким же, как и у гена, кодирующего зеленый пигмент.

Два гена, имеющиеся у дихроматов, не воспринимающих зеленого цвета (G^-R^+), вероятно, проявляются как гены красного пигмента, поскольку 3'-часть гибридного гена получена от гена красного пигмента. Так как 5'-конец гибридного гена принадлежит гену зеленого пигмента, то, вероятно, в клетках, которые в норме должны были бы стать зелеными колбочками, экспрессируется гибридный «красный» пигмент. Таким образом, нормальные красные колбочки, очевидно экспрессируют красный пигмент, а нормальные зеленые колбочки могут экспрессировать гибридный «красный» пигмент.

Аномальные по красному цвету трихроматы (G^+R^+) несут два нормальных гена зеленого пигмента, которые, вероятно, нормально экспрессируются в зеленых колбочках. Гибридный ген, который, по-видимому, экспрессируется в красных колбочках, должен кодировать пигмент с измененной спектральной чувствительностью, поскольку у таких трихроматов цветовое видение нарушено.

Аномальные по зеленому цвету трихроматы ($G'R^+$) несут один нормальный ген красного пигмента и один нормальный ген зеленого пигмента, каждый из которых экспрессируется, по-видимому, в соответствующих колбочках. Гибридный ген содержит 3'-конец гена красного пигмента и, таким образом, или определяет чувствительность к красному цвету, или кодирует пигмент с измененной спектральной чувствительностью. Поскольку его 5'-конец получен от гена зеленого пигмента, гибридный ген, видимо, экспрессируется в зеленых колбочках. Присутствие в одной колбочке смеси зеленого и красного пигментов или зеленого пигмента и пигмента с измененной спектральной характеристикой, очевидно, меняет обычную спектральную чувствительность колбочки, что приводит к аномальному восприятию зеленого цвета.

Литература: Nathans, J.; Piantanida, T. P.; Eddy, R. L.; Shows, T. B.; Hogness, D. S. Molecular genetics of inherited variation of human color vision. Science 232, 203-210, 1986.

10-35

А. Перенос Ту-элемента зависит от обратной транскрипции промежуточной РНК. В норме обратная транскриптаза экспрессируется на очень низком уровне. Однако в вашей модифицированной плазмиде обратная транскриптаза находится под контролем элементов, регулирующих синтез галактозы. В при-

приблизительно определить границы исходя из точки, где последовательности начинают дивергировать. Во-вторых, можно принять во внимание общие свойства процесса встраивания *Alu*-последовательностей, а именно дупликацию хромосомных последовательностей в сайте встраивания. Сравнение последовательностей, расположенных слева и справа от каждой *Alu*-последовательности, показывает, что они тандемно повторены — один конец каждой дупликации расположен точно в месте предполагаемой границы, определенной методом вертикального сравнения.

Мутации во фланкирующих последовательностях легко выявить путем сравнения повторяющихся последовательностей, которые возникли при встраивании каждой *Alu*-последовательности в хромосому.

- Б. Как показано на рис. 10-36, в дуплицированной ДНК, которая окружает *Alu*-последовательности, на 120 нуклеотидов имеется 5 замен нуклеотидов. Если исходить из того, что в одном сайте за миллион лет происходит 3×10^{-3} замен, то *Alu*-последовательности встроились в семейство генов альбумина человека около 14 млн. лет назад.

$$\text{Время после встраивания} = \frac{10^6 \text{ лет} \times 1 \text{ сайт}}{3 \times 10^{-3} \text{ мутаций}} \times \frac{5 \text{ мутаций}}{120 \text{ сайтов}} = 14 \times 10^6 \text{ лет.}$$

- В. Эти особенности последовательностей, окружающих *Alu*, очень важны для расчетов, поскольку они возникли при встраивании *Alu*-последовательностей в семейство генов альбумина человека. Следовательно, последовательности, которые образуют дупликации в сайте-мишени, отмечают время встраивания *Alu*-последовательности.

Дополнительные последовательности интрона не помогут в расчетах, поскольку мутации вне дуплицированного сайта-мишени никак не связаны со временем встраивания *Alu*-последовательностей. Мутации в *Alu*-последовательностях сами по себе также бесполезны для определения времени встраивания. Некоторые из наблюдаемых в *Alu*-последовательностях мутаций весьма вероятно могли возникнуть, когда эти последовательности находились в другой области генома, т. е. до того как их копии встроились в последовательности семейства генов альбумина человека.

- Г. Расчет, приведенный в пункте Б, позволяет сделать вывод, что *Alu*-последовательности внедрились в семейство генов альбумина человека около 14 млн. лет назад, т. е. через большой промежуток времени после дивергенции млекопитающих и разделения ветвей, давших начало крысе и человеку.

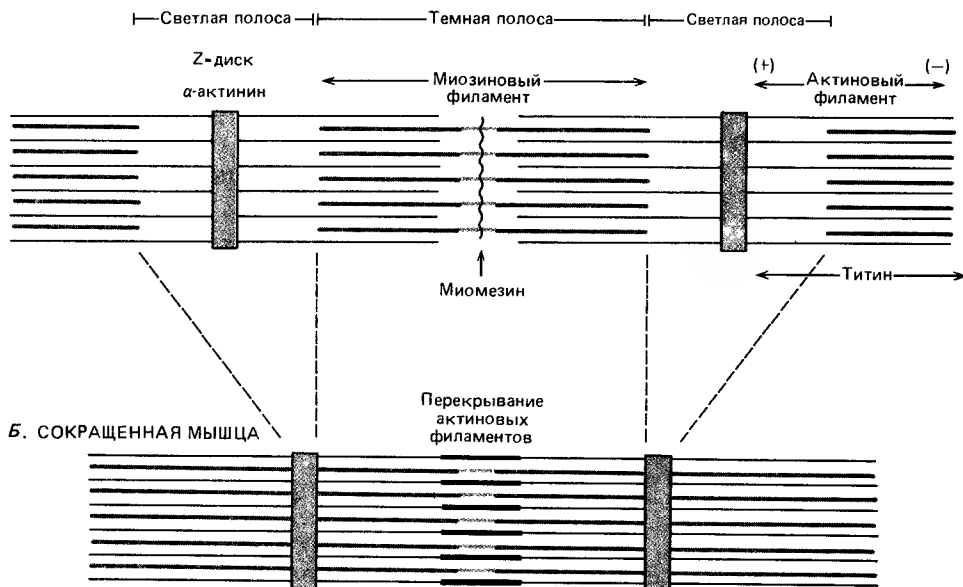
Мышечное сокращение**11-1**

- А. цитоскелет
- Б. миофибриллы
- В. саркомеры
- Г. актин
- Д. миозин
- Е. скрученная спираль
- Ж. минус-концы; плюс-концы
- З. тропомиозин; тропонин
- И. гладкие мышцы
- К. сократительное кольцо
- Л. нити напряжения

11-2

- А. Правильно.
- Б. Правильно.
- В. Правильно.
- Г. Неправильно. Молекула миозина состоит из двух тяжелых цепей и двух пар легких цепей, т.е. всего из шести субъединиц.
- Д. Неправильно. В отсутствие актина миозин связывает и гидролизует одну молекулу АТФ очень быстро, но продукты гидролиза остаются связанными с ним – поэтому как АТФазы в чистом виде он очень неэффективен.
- Е. Правильно.
- Ж. Неправильно. Мышца перестает сокращаться, потому что падает концентрация Ca^{2+} в цитозоле. Ионы Ca^{2+} откачиваются с помощью Ca^{2+} -насоса, использующего энергию гидролиза АТФ. Уровень же АТФ в ходе сокращения существенно не меняется.
- З. Правильно.
- И. Правильно.
- К. Правильно.
- Л. Правильно.
- М. Неправильно. Белые мышечные клетки приспособлены для анаэробного сокращения (они синтезируют АТФ в процессе гликолиза – анаэробный процесс), а красные мышечные клетки – для аэробного сокращения (в них АТФ синтезируется в процессе окислительного фосфорилирования в митохондриях – аэробный процесс). Цвет красных мышечных клеток обусловлен высоким содержанием в них белка миоглобина, который, связывая кислород, создает его «аварийный запас» и предохраняет клетки от кратковременного кислородного голодания.

А. РАССЛАБЛЕННАЯ МЫШЦА



Б. СОКРАЩЕННАЯ МЫШЦА

Рис. 11-25. Схематическое изображение электронных фотомикрографий, представленных на рис. 11-1 (ответ 11-3). А. Расслабленная мышца. Б. Мышца в состоянии сокращения.

11-3

- А. Местоположение компонентов поперечнополосатой мышцы на электронной микрографии схематично показано на рис. 11-25, А. α-актинин — это компонент Z-диска; титин соединяет концы миомиозинных филаментов с Z-диском; миомезин связывает вместе соседние миомиозинные филаменты с образованием гексагональной упаковки в центральной части саркомера.
- Б. На рис. 11-1, Б представлена фотомикрография сверхсокращенной мышцы. Соответственно светлая полоса полностью отсутствует; вместо нее в середине саркомера появилась новая полоса — результат перекрывания актиновых филаментов. Две электронные фотомикрографии, приведенные на рис. 11-1, представлены в виде схем на рис. 11-25, Б.

11-4

- А. Две спирали молекул миозина будут плотно пригнаны друг к другу (рис. 11-26). Согласно нумерации на рис. 11-2, индивидуальные молекулы миозина на концах каждой спирали будут соединяться конец в конец в следующем порядке: 1 с 6', 2 с 5', 3 с 4', 4 с 3', 5 с 2', 6 с 1' (номера со штрихом соответствуют второй спирали).

Пытаясь мысленно соединить два конца, вы, несомненно, обнаружили, что это непростая задача. Однако можно легко продемонстрировать это на модели: уложите шесть карандашей вокруг седьмого (центрального) и скрепите их резинкой; затем сдвигайте карандаши по очереди на некоторое расстояние так, чтобы их концы расположились по спирали вокруг продольной оси. Если взять два таких пучка, то их легко плотно соединить друг с другом. Для понимания геометрических принципов сборки белков в ансамбли весьма полезно поиграть с реальными предметами, моделирующими белковые молекулы; так гораздо легче зрительно представить процесс сборки.

- Б. Размер гладкой зоны — это расстояние между первыми головками миозина на противоположно ориентированных спиралях (рис. 11-26). Две ближайшие друг к другу головки будут расположены на

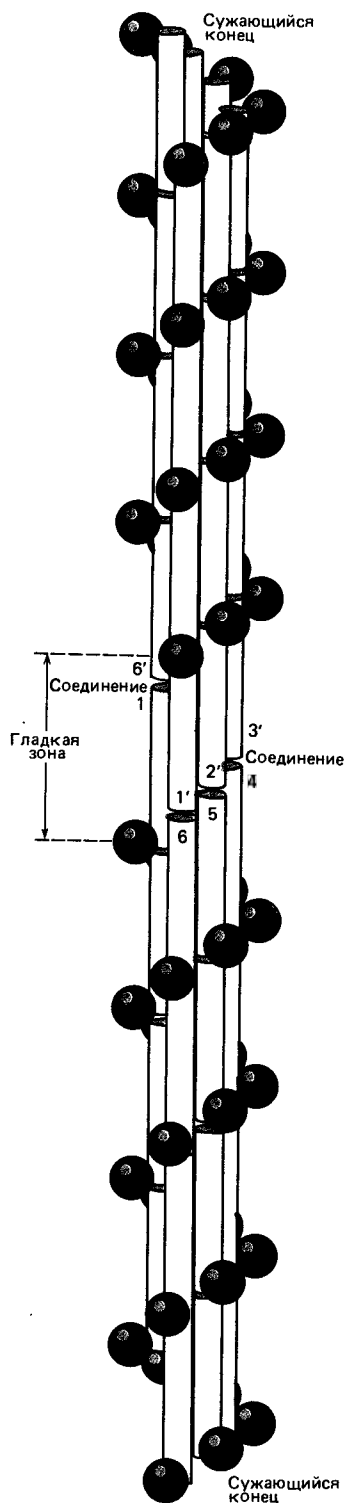


Рис. 11-26. Толстый филамент миозина (ответ 11-4).

молекулах миозина 1 и 1' (в соответствии с нумерацией на рис. 11-2), и расстояние между ними должно быть равно длине палочки миозина (150 нм) плюс 1/6 часть этой длины (25 нм) — сдвиг, обусловленный спиральным смещением (миозин 1' прилегает к миозину 6). Рассчитанный таким образом размер гладкой зоны вполне приемлемо согласуется с ее измеренной величиной — 175 нм и 160 нм соответственно.

- В. Сужение толстых филаментов миозина на концах — очевидное следствие их спиральной структуры. Последовательные поперечные срезы на концах филамента должны выявлять сначала 6 молекул миозина, затем 5, затем 4 и т. д. до одной — естественное утоньшение филамента к концу (рис. 11-26). Действительно, на электронных фотомикрографиях сужение наблюдается на последнем отрезке филамента (длиной 100–150 нм), что согласуется с данным объяснением.
- Г. Спираль, построенная из субъединиц (например, молекул миозина), не имеет в своей структуре каких-то внутренних свойств, которые определяли бы ее длину. Средняя длина спирали зависит от общей концентрации субъединиц и относительных скоростей сборки и разборки на концах, однако даже в постоянных условиях будет наблюдаться заметная вариабельность длины. Замечательное однообразие толстых филаментов по длине в поперечнополосатых мышцах обусловлено, по-видимому, еще чем-то, кроме самих молекул миозина: например, некой связанной с миозиновым филаментом молекулой, которая и определяет его длину. Действительно, подобные молекулы известны для некоторых других спиральных биологических структур с фиксированной длиной. В частности, длина капсида вируса табачной мозаики и хвоста бактериофага лямбда (оба они имеют спиральную структуру) определяется как раз такими молекулами, идущими от одного конца спирали до другого.

В этой задаче мы попытались показать, что понимание принципов организации белковых ансамблей позволяет лучше разобраться в биологической структуре. Зная эти принципы, мы можем определить, где структурное свойство прямо связано с характером сборки белковых ансамблей (как в случае гладкой зоны и сужения конца толстого филамента), а где оно требует наличия какого-то дополнительного компонента (на что указывает одинаковая длина толстых филаментов в поперечнополосатых мышцах).

11-5

- А. Наличие АТФ в омывающем буфере не приводило к сокращению, так как в среде отсутствовали ионы Ca^{2+} . В отсутствие Ca^{2+} связывающие миозин участки на актине закрыты тропонин-тропомиозиновым комплексом, поэтому сокращение невозможно.
- Б. Самый трудный для понимания факт — это сокращение, которое наблюдается при удалении АТФ. Действительно, если в среде нет Ca^{2+} , то как миозин может связаться с актином? Ключом к объяснению является низкая скорость сокращения. «Открытые» и «закрытые» конфигурации миозин-связывающих участков актина присутствуют в равновесных количествах; в отсутствие Ca^{2+} равновесие сильно сдвинуто в сторону «закрытого» состояния. Тем не менее новые «открытые» участки будут постоянно возникать именно благодаря равновесной природе перехода, а коль скоро они появляются, с ними свяжется комплекс миозин-АДР. После этого миозиновые головки претерпевают конформационное изменение,

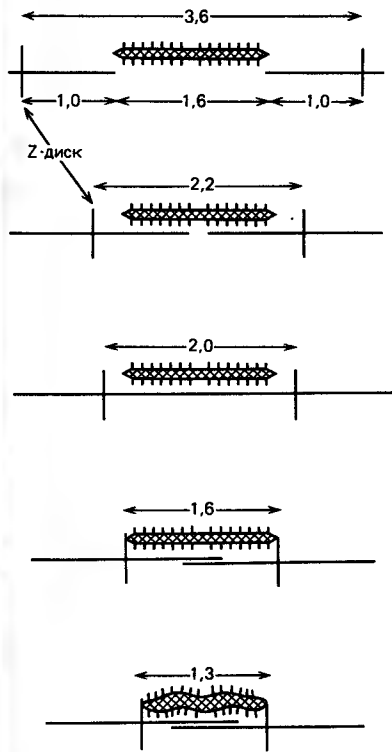


Рис. 11-27. Схематическое изображение саркомеров для точек, указанных стрелками на рис. 11-5 (ответ 11-6).

за счет которого и создается напряжение. Если в среде нет АТФ, способного вызвать диссоциацию и расслабление, то образованный актомиозиновый комплекс будет «заморожен» в таком состоянии. (Этот комплекс известен как «окоченевший», ибо он является основной причиной трупного окоченения.) По мере того как все новые головки миозина вовлекаются в процесс, напряжение усиливается. По-видимому, некий фоновый уровень связывания миозина существует и в обычной расслабленной мышце (т.е. в отсутствие Ca^{2+}), но АТФ постоянно вызывает диссоциацию миозиновых головок, и мышца остается расслабленной.

- В. Внезапное и резкое расслабление мышечного волокна при освещении его лазерной вспышкой происходит потому, что освобожденный АТФ связывается с миозиновыми головками и приводит к диссоциации их комплекса с актином. Разрыв всех поперечных миозиновых мостиков позволяет актиновым филаментам вернуться в исходное, покоящееся состояние.

Литература: Goldman, Y. E.; Hibberd, M. G.; McGray, J. A.; Trentham, D. R. Relaxation of muscle fibers by photolysis of caged ATP. *Nature* 300: 701–705, 1980.

- 11-6 Схематичное изображение саркомеров в каждой из «стрел» (см. рис. 11-5), дано на рис. 11-27. Как показано на этих рисунках, увеличение напряжения и уменьшение длины саркомера в сегменте I происходит из-за увеличения числа взаимодействий между актином и миозиновыми головками. В сегменте II актиновые волокна начинают проникать в гладкую зону миозинового филамента, и тут развиваемое напряжение выходит на плато, ибо число головок миозина, взаимодействующих с актином, сохраняется постоянным. В сегменте III актиновые филаменты начинают перекрываться друг с другом, в результате оптимальное взаимодействие миозина и актина нарушается и напряжение в саркомере уменьшается. Наконец, в сегменте IV промежуток между Z-дисками становится меньше длины миозиновых (толстых) филаментов, те деформируются и напряжение в мышце резко падает.

Литература: Gordon, A. M.; Huxley, A. F.; Julian, F. J. The variation in isometric tension with sarcomere length in vertebrate muscle fibers. *J. Physiol.* 184: 170–192, 1966.

11-7

- А. Свободная химическая энергия, необходимая для совершения каждого цикла, освобождается при гидролизе АТФ. Гидролиз АТФ – это самый распространенный, но не единственный источник свободной химической энергии. Так, при транспорте сахаров в животных клетках обычно используется свободная энергия градиента ионов Na^+ , а перемещение цепей мРНК и строящегося полипептида на рибосоме в процессе белкового синтеза происходит за счет энергии гидролиза GTP.

Механическая работа, совершаемая при сокращении мышцы, – это движение актиновых тонких филаментов относительно миозиновых толстых филаментов. Механическая работа, производимая при активном транспорте Ca^{2+} , – это выкачивание ионов против градиента их концентрации (из клетки наружу).

- Б. При мышечном сокращении в каждом цикле возникновения и разрыва поперечных мостиков актин вначале прочно связывается, а затем освобождается; точно так же Ca^{2+} вначале прочно связывается, а потом освобождается в процессе активного транспорта.

На рис. 11-6, А везде, где актин и миозин изображены в контакте друг с другом, актин прочно связан с миозином. Связывая АТР, головка миозина переходит в состояние низкого сродства к актину, что позволяет ей отделиться от активного филамента и принять «вертикальную» конформацию. (Хотя каждая из этих стадий показана на схеме отдельно, процесс выглядит, по-видимому, так: связывание АТР вызывает конформационное изменение, в результате которого уменьшается сродство миозина к актину; происходит отделение актина, и конформационное изменение завершается).

На рис. 11-6, Б ионы Ca^{2+} прочно связаны с транспортным белком, когда они находятся внутри клетки (верхний рисунок), и связаны слабо, когда они находятся снаружи (нижний рисунок). Различие в прочности связывания на схеме не отражено, оно следует из концепции активного транспорта. Действительно, поскольку насос переносит ионы Ca^{2+} против градиента их концентрации, он должен иметь высокое сродство к ним на внутренней стороне клетки (чтобы эффективно связывать Ca^{2+} при его низкой внутриклеточной концентрации) и низкое сродство на внешней стороне клетки (чтобы связанный Ca^{2+} мог быть «выброшен», несмотря на высокую концентрацию его снаружи).

- В. В обоих циклах «рабочий ход» — это конформационное изменение, которое на рисунках (см. рис. 11-6, А и Б) изображено справа; «возвратный ход» в каждом случае — это также конформационное изменение, изображенное на левой стороне рисунков.

Литература: Eisenberg, E.; Hill, T.L. Muscle contraction and free energy transduction in biological systems. Science 227:999 1006, 1985.

Актиновые филаменты и клеточный кортекс

11-8

- А. клеточный кортекс
- Б. филамин
- В. гельзолин
- Г. ток цитоплазмы
- Д. микроворсинки
- Е. терминальная сеть
- Ж. фокальные контакты (пластинки прикрепления)
- З. «тредмиллинг»
- И. микрошипы
- К. ламеллоподии

11-9

- А. Правильно.
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. Ток цитоплазмы у *Nitella* происходит, по-видимому, с участием поляризованного слоя актиновых филаментов.
- Г. Неправильно. Актин в форме очень коротких филаментов присоединен к спектрину, связанному с анкирином, который в свою очередь соединен с белком полосы 3 — трансмембранным белком, непосредственно осуществляющим контакт всех упомянутых белков с плазматической мембраной.
- Д. Правильно.
- Е. Неправильно. Критической называется такая концентрация актина, при которой актиновые филаменты в среднем не растут и не укорачиваются.
- Ж. Правильно.

- З. Правильно.
- И. Правильно.
- К. Неправильно. Цитохалазин ингибирует цитокинез (разъединение дочерних клеток при митозе), но совершенно не влияет ни на расхождение хромосом, ни на деление ядра.

11-10

- А. Роль гидролиза АТР в сокращении терминальной сети двоякая: 1) фосфорилирование одной из легких цепей миозина, которое позволяет миозиновым головкам вступить во взаимодействие с актиновыми филаментами и произвести сокращение, и 2) обеспечение свободной энергией процесса перемещения миозиновых филаментов относительно актиновых. АТР- γ -S способен заменить АТР в активировании миозина, так как терминальный (тио)фосфат из АТР- γ - ^{35}S (но не ИТР- γ - ^{32}P !) может быть перенесен на легкие цепи миозина. ИТР же способен заменить АТР в обеспечении энергией относительного перемещения филаментов актина и миозина: ИТР (но не АТР- γ -S) вызывает сокращение терминальной сети в присутствии активированного миозина.

Б. Обе эти функции АТР зависят от расщепления концевой фосфодиэфирной связи, в то время как каждый из аналогов заменяет АТР лишь в выполнении какой-то одной из них. Таким образом, концевая фосфодиэфирная связь в каждом аналоге может быть гидролизована; почему же тогда они различаются по своей способности заменять АТР в мышечном сокращении? Причина – в разной специфичности катализирующих гидролиз ферментов. Киназа легких цепей миозина может гидролизовать АТР- γ -S, но не ИТР: по-видимому, для связывания с этим ферментом решающее значение имеет тот участок молекулы, по которому ИТР отличается от АТР. Миозин же способен гидролизовать ИТР, но не АТР- γ -S, вероятно, потому, что молекула АТР- γ -S отличается от АТР по участку, влияющему на связывание нуклеотида миозином либо на каталитическую функцию последнего.

Вообще для протеинкиназ (в частности, для киназы легких цепей миозина) довольно характерна способность переносить на свои белки-субстраты концевой тиофосфат с АТР- γ -S, тогда как использовать ИТР в качестве донора фосфата они не могут. Напротив, ферменты, которые гидролизуют АТР для совершения механической работы (например, миозин), обычно могут использовать для этого ИТР, а АТР- γ -S для них непригоден.

Литература: Broschat, K. O.; Stidwell, P. R.; Burgess, D. R. Phosphorylation controls brush border motility by regulating myosin structure and association with the cytoskeleton. Cell 35: 561–571, 1983.

11-11

- А. Как показала электронная микроскопия, в норме мономеры актина присоединяются к оперенному (плюс-) концу декорированных актиновых филаментов в 4 раза быстрее, чем к заостренному (минус-) концу. Скорость сборки на разных концах можно определить, измерив длину (т.е. подсчитав число субъединиц на рис. 11-9) заново образованных участков актиновых филаментов у плюс- и минус-концов.
- Б. Как видно на фотомикрографии, влияние цитохалазина В на сборку филаментов заключается в остановке полимеризации актина на плюс-конце – основном месте присоединения новых мономеров. Одним из механизмов такого ингибирования может быть связывание цитохалазина В с плюс-концом актинового

филамента, в результате которого ингибитор физически блокирует присоединение новых мономеров актина.

На основе этого механизма можно объяснить результаты измерений вязкости. Поскольку ингибирование не затрагивает минус-конца, филаменты продолжают расти, но гораздо медленнее. Меньшая скорость роста филаментов — это причина более медленного увеличения вязкости, а меньшее значение вязкости на плато говорит о том, что в присутствии цитохалазина В актиновые филаменты имеют меньшую длину. Почему же они не вырастают в конце концов до той же длины, что и без цитохалазина, хотя бы и с меньшей скоростью? Филаменты получаются короче при росте только с минус-конца потому, что критическая концентрация для сборки на минус-конце выше, чем для сборки на плюс-конце. Иначе говоря, равновесие сборки на минус-конце сдвинуто в сторону свободных мономеров больше, чем на плюс-конце. Различие констант равновесия означает, что филаменты, растущие на плюс-конце (или сразу на обоих концах) будут длиннее филаментов, растущих только на минус-конце.

- В. В норме актиновые филаменты растут на плюс- и минус-концах с различными скоростями. Это наблюдение говорит о том, что в процессе присоединения к филаменту мономеры, по-видимому, изменяют свою конформацию. Если бы все субъединицы — и свободные, и входящие в состав филамента — имели одинаковую конформацию, то скорости роста филаментов на двух концах были бы одинаковыми. Действительно, поскольку в этом случае взаимодействия на обоих концах должны быть идентичными, то скорости сборки и разборки, определяемые этими взаимодействиями, должны быть одними и теми же для концов обоих типов (не зависеть от типа конца). Следовательно, скорости роста могли бы быть одинаковыми (см. МБК, рис. 11-1).

Предположение о связывании цитохалазина В с актиновым филаментом (по-видимому, с плюс-концом), но не с мономером актина, также согласуется с представлением об изменении конформации актина в процессе полимеризации: ведь если у мономера актина есть две конформации, то вполне возможно, что цитохалазин В связывается лишь с одной из них. Это менее сильный довод, чем предыдущий, потому что можно представить себе такое же действие цитохалазина при связывании его с участком на филаменте, образованном соседними мономерами (место связывания, имеющееся только на полимере). Из двух этих предположений следуют разные предсказания о числе молекул цитохалазина В, связываемых одним филаментом. Хотя это число трудно измерить с достаточной точностью, однако имеющиеся данные говорят в пользу связывания в соотношении 1:1 (одна молекула цитохалазина В на филамент).

Литература: MacLean-Fletcher, S.; Pollard, T.D. Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell* 20:329–341, 1980.

11-12

- А. Хотя конечные показатели (в молях) полимеризации актина и гидролиза АТФ одинаковы, начальная скорость гидролиза АТФ меньше, чем начальная скорость полимеризации. (Сравните наклон двух кривых на рис. 11-10 при короткой экспозиции.) К тому времени, когда весь актин уже полимеризовался (примерно через 30 с), гидролизилось менее половины АТФ. Именно эту разницу в начальных скоростях отметил преподаватель, и по его

А. МОНОМЕР АКТИНА



Б. ПОЛИМЕР АКТИНА

Плюс-конец
(быстро растущий)

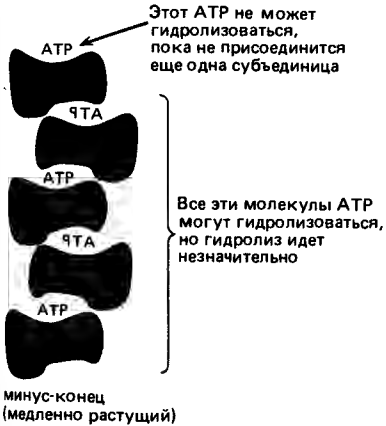


Рис. 11-28. Модель гидролиза актина в собранном полимере (ответ 11-12). А. Гипотетическая организация сайта связывания АТР и сайта гидролиза АТР в мономере актина. Б. Гипотетическая организация сайтов связывания и гидролиза в актиновом филаменте. Расположение субъединиц, повернутых обратной стороной и отмеченных обратным написанием АТР, отражает спиральную организацию филаментов актина.

справедливому утверждению, она доказывает, что актин может полимеризоваться и в отсутствие гидролиза АТР.

- Б. Поскольку скорость полимеризации выше, чем скорость гидролиза АТР, вновь присоединившиеся субъединицы актина должны нести связанный АТР. Поскольку этот связанный АТР гидролизуется не сразу, то растущий актиновый филамент имеет «шапочку» из АТР. После того как мономер актина с АТР присоединился к филаменту, АТР может быть гидролизован. Одно из возможных объяснений того, почему АТР может гидролизироваться в полимере, но не в мономере, показано на рис. 11-28. Если на «макушке» актинового мономера находится участок связывания АТР, а на его «доннышке» — каталитический центр, где АТР гидролизуется, то способность к гидролизу АТР будет проявляться только у полимера. (Истинное расположение связывающих и гидролитических участков неизвестно.) Данная модель предсказывает, что в конце концов все субъединицы актина (в полимере) будут нести АТР, за исключением одной концевой субъединицы, с которой будет связан АТР.

Литература: Carlier, M.-F.; Pantaloni, D.; Korn, E. D. Evidence for an ATP cap at the ends of actin filaments and its regulation of the F-actin steady state. *J. Biol. Chem.* 259:9983-9986, 1984.

11-13

- А. Восходящие участки кривых на рис. 11-11 лучше согласуются с предположением о присоединении актиновых мономеров к акросомальному отростку на конце, а не у основания. Все шесть точек восходящего участка графика, выражающего зависимость длины от квадратного корня из времени, ложатся на прямую; на графике же зависимости длины от времени в его восходящем участке прямой можно соединить не более трех-четырех точек. Это означает, что удлинение акросомального отростка замедляется так, как если бы скорость процесса лимитировалась диффузией, и можно предположить, что присоединение новых субъединиц происходит на конце отростка. В независимых экспериментах с использованием миозинового «декора» обнаружилось, что конец отростка соответствует плюс-концам филаментов, где и должен происходить их рост.

- Б. То, что в начале и в конце акросомальной реакции скорость удлинения отростка снижена, не вызывает удивления. В начале процесс идет медленно потому, что требуется какое-то время для диффузии субъединиц из места хранения в точку сборки; в конце процесс замедляется (и попросту останавливается), так как запас субъединиц оказывается исчерпанным.

Литература: Tilney, L. G.; Inoue, S. Acrosomal reaction of *Thyone* sperm. II. The kinetics and possible mechanism of acrosomal process elongation. *J. Cell Biol.* 93:820-827, 1982.

Движение ресничек

11-14

- А. реснички
- Б. жгутик
- В. аксонема
- Г. тубулин
- Д. динеин
- Е. центриоли
- Ж. центросома

11-15

- А. Правильно.
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. Скольжение микротрубочек в аксонеме осуществляется с помощью динеина, а не миозина. Однако механизм действия динеина, по-видимому, очень похож на механизм действия миозина.
- Г. Неправильно. Скользят и смещаются относительно друг друга соседние дублеты микротрубочек в периферическом кольце; центральная пара микротрубочек выполняет в основном регуляторную роль.
- Д. Правильно.
- Е. Неправильно. Хотя до сих пор неясно, чем контролируется и координируется биение ресничек, ток ионов Ca^{2+} , по-видимому, здесь ни при чем: выделенные аксономы нормально работают и в отсутствие плазматической мембраны.
- Ж. Правильно.
- З. Неправильно. Синдром Картагенера проявляется у людей, а не у одноклеточных водорослей.
- И. Правильно.
- К. Правильно.
- Л. Правильно.

11-16

- А. Компоненты жгутика под номерами в соответствии с рис. 11-12 перечислены ниже.
 1. Внутренняя оболочка
 2. Радиальная спица
 3. Субфибрилла А
 4. Внутренняя динеиновая ручка
 5. Субфибрилла В
 6. Одиночная микротрубочка
 7. Нексин
 8. Наружная динеиновая ручка
- Б. А- и В-трубочки наружных дублетов и микротрубочки центральной пары построены из α - и β -тубулинов.
- В. Непрерывную структуру с базальным тельцем образуют лишь наружные дублеты жгутика; они являются продолжением субфибриллы А и субфибриллы В наружных триплетов базального тельца.

- 11-17 Соседние реснички на рис. 11-13 ориентированы одинаково, если судить по их центральным парам микротрубочек. Такая идентичная ориентация наводит на мысль, что какие-то структурные свойства аксономы ограничивают возможные направления изгиба (иначе говоря, сама конструкция ресничек позволяет им изгибаться лишь определенным образом). Ориентация центральной пары микротрубочек коррелирует с направлением изгиба: он всегда происходит в плоскости, проходящей через две центральные микротрубочки. Чтобы это стало яснее, представьте, что аксонема, показанная на рис. 11-12 в виде поперечного среза, продолжается из страницы вверх; изгибаться она может в направлении верха или низа страницы, но не вправо или влево. (Мало того, у многих аксоном пар соседствующих периферических дублетов — на рис. 11-12 это два самых нижних дублета — «сшиты» таким образом, что не могут скользить относительно друг друга. Эта модификация накладывает дополнительные ограничения на возможные направления изгиба.)

Если микротрубочки в центральном дублете расположены параллельно друг другу по всей длине реснички, то весь изгиб реснички – и при рабочем ходе, и при возвратном ходе – должен происходить в одной плоскости. Однако нередко микротрубочки центральной пары обвиваются одна вокруг другой, и тогда плоскость изгиба поворачивается по мере того, как волна изгиба бежит вверх по ресничке. Вследствие такого устройства рабочий ход у реснички получается однонаправленным (он зависит только от ориентации центральной пары в основании реснички), а возвратный ход – спиральным (изгиб распространяется по ресничке).

11-18

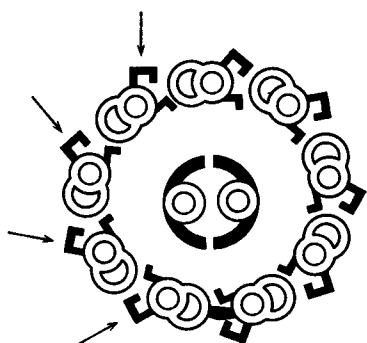
- А. Когда жгутик изогнут в полукольцо, дублет, находящийся с внутренней стороны полукольца, будет смещен относительно того дублета, который находится на внешней стороне полукольца на расстояние, равное разности периметров двух этих полуокружностей – «внутренней» и «наружной» (рис. 11-15). Поскольку периметр полуокружности равен πr , разность между «наружным» и «внутренним» периметрами составит $\pi(r + 180 \text{ нм}) - \pi r = \pi \times 180 \text{ нм}$, т. е. около 565 нм. Это соответствует примерно 70 тубулиновым димерам.

Возможно, несколько неожиданным кажется то, что приведенный результат никак не зависит от радиуса полуокружности. Однако это так: можно опоясать жгутиком половину земного шара, а результат будет тем же: «внутренний» дублет по-прежнему будет выступать из-за «наружного» на 565 нм.

- Б. Длину растянутой молекулы нексина также можно рассчитать, исходя из простых геометрических правил. Растянутая молекула нексина является гипотенузой прямоугольного треугольника со стороной 30 нм (расстояние между соседними дублетами) и другой стороной, составляющей по длине разность периметров двух полуокружностей, образуемых соседними дублетами (ее можно рассчитать, как в пункте А). Вторая сторона равна $\pi(r + 30 \text{ нм}) - \pi r = \pi \times 30 \text{ нм}$ (примерно 94 нм). Гипотенуза прямоугольного треугольника равна квадратному корню из суммы квадратов сторон; следовательно, длина растянутой молекулы нексина составит $[(30 \text{ нм})^2 + (94 \text{ нм})^2]^{1/2}$, что составляет приблизительно 99 нм. Из расчета следует, что молекула нексина способна удлиняться при растяжении более чем в три раза. Независимые экспериментальные измерения подтвердили необычайную эластичность нексина.
- В. Характер биения жгутиков у мутантов отличается тем, что в ходе махового цикла изгибы разного «знака» сменяют друг друга. В цикле жгутика дикого типа изгиб всегда «положительный» (вправо на рис. 11-14, А). У мутанта же «положительный» изгиб, с которого начинается рабочий ход (рис. 11-14, Б), сменяется «отрицательным» в начале возвратного хода (в основании жгутика 6 на рис. 11-14, Б). Эти перемежающиеся изгибы в противоположных направлениях и определяют характерную картину биения жгутика у мутантов.

В жгутиках дикого типа «отрицательное» изгибание должно каким-то образом подавляться – это существенно для генерации максимально асимметричного удара, обеспечивающего полноценную подвижность *Chlamydomonas*. То, что у мутантных жгутиконосцев «отрицательное» изгибание не подавляется, дает основание предполагать, что одной из функций радиаль-

А. Изгибание вверх



Б. Изгибание вниз

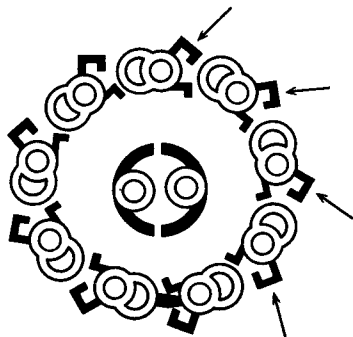


Рис. 11-29. Распределение активности динеина по аксонеме, которое могло бы обеспечить ее изгибание в плоскости (один из возможных вариантов) (ответ 11-19). А. Изгибание вверх. Б. Изгибание вниз. Стрелками указаны работающие динеиновые ручки.

11-19

ных спиц и центральных микротрубочек в норме является именно подавление изгибания в «отрицательном» направлении.

Литература: Gibbons, I. R. Cilia and flagella of eukaryotes. *J. Cell Biol.* 91:107s–124s, 1981.

Brokaw, C. J.; Luck, D. J. L.; Huang, B. Analysis of the movement of *Chlamydomonas* flagella: the function of the radial-spoke system is revealed by comparison of wild-type and mutant flagella. *J. Cell Biol.* 92:722–732, 1982.

Одно из возможных распределений активности динеина, которое могло бы вызывать изгиб аксонемы в плоскости, представлено на рис. 11-29. Если динеиновые ручки на левой половине аксонемы активны (стрелки на рис. 11-29, А), а на правой – нет, ресничка будет изгибаться вверх. Представить это в пространстве трудно, поэтому рассмотрим ситуацию шаг за шагом. 1) Ориентация аксонемы на рис. 11-28 стандартная, т. е. конец аксонемы лежит ниже плоскости страницы. 2) Динеиновые ручки толкают соседние с ними дублеты в направлении *конца* аксонемы, так что те смещаются в направлении под плоскость страницы. 3) Верхний дублет на рис. 11-28, А будет вытолкнут в этом направлении дальше всех, потому что его общее смещение равно сумме смещений, вызываемых каждой из четырех работающих динеиновых ручек. 4) Дублет, сдвигающийся дальше всех, определяет внутреннюю сторону изгиба (см. рис. 11-15). Таким образом, поскольку дальше всех смещается верхний дублет, то аксонема – при активности динеиновых ручек на ее левой половине – будет изгибаться вверх (в направлении верха страницы).

Точно так же изгиб аксонемы вниз (в направлении низа страницы) объясняется тем, что динеиновые ручки на правой половине аксонемы работают, а на левой – нет (рис. 11-28, Б).

Как в действительности распределяется активность динеина в ресничке, когда происходит ее планарное изгибание, пока неясно. Естественные кандидаты на роль регуляторных элементов – это две центральных одиночных микротрубочки: они окружены неодинаковыми белками; они взаимодействуют с разными группами периферических дублетов; они, наконец, связаны (через другие структуры) с двумя различными группами динеиновых ручек – с теми, работа которых лежит в основе предложенной здесь модели.

11-20

- А. Если затронутый ген контролировал синтез белков, не образовавшихся в мутантном жгутике, то эти белки должны отсутствовать также и в гаметах мутанта. После слияния жгутики мутанта восстановили бы подвижность в результате дополнения их немечеными компонентами из нерадиоактивных гамет дикого типа (поскольку синтез всех белков подавлен). В итоге радиоавтограф электрофоретической картины для таких жгутиков не отличался бы от радиоавтографа для жгутиков мутанта.

Напротив, если измененный ген кодирует белок, который должен встраиваться в аксонему до того, как к ней присоединятся другие белки, то в гаметах мутанта должны присутствовать в функциональном состоянии все белки, кроме дефектного. Поскольку мутант рос на радиоактивной среде, эти белки должны были включить метку. После слияния жгутик мутанта

мог восстановить подвижность в результате сочетания меченых компонентов из гамет мутанта и немеченых компонентов из гамет дикого типа. Единственным исключением был бы белок, кодируемый дефектным геном: он мог появиться только из гамет дикого типа и соответственно не содержал бы метку. В этих условиях радиоавтограф электрофоретической картины для химерных жгутиков должен был быть таким же, как для жгутиков дикого типа, за исключением одного недостающего пятна. Это недостающее пятно и соответствовало бы продукту поврежденного гена.

- Б. Анализ внутригенных ревертантов по второму сайту также позволяет различить две эти возможности. Если измененный ген кодирует белок, входящий в состав собранной аксономы, то некоторые ревертанты (а именно те, у которых изменено число заряженных аминокислот в белке) будут давать распределения, где одно пятно смещено (обычно слегка влево или вправо от нормального положения из-за влияния заряда на изоэлектрическую точку белка). Если поврежденный ген контролировал синтез 17 недостающих белков, то ни у одного из ревертантов картина не должна была меняться (так как ни одного из составляющих аксоному белков эта мутация напрямую не затрагивает). Этот подход менее однозначен, чем первый, поскольку неизменная картина не позволяет однозначно заключить, что дефектный ген регулирует синтез других белков – возможно, что просто было проверено недостаточно много ревертантов.

В целом два этих метода оказались весьма мощным средством анализа жгутиковых мутантов. У большинства мутантов, включая *pf14*, с их помощью было выявлено прямое влияние мутаций на процесс сборки (т.е. показано, что мутантные гены кодируют белки, образующие часть структуры аксономы). Более того, оба этих метода давали одинаковые результаты при выявлении белка, кодируемого поврежденным геном: немеченое пятно при анализе дикариона соответствовало смещенному пятну при анализе ревертантов.

Литература: Luck, D.J.L. Genetic and biochemical dissection of the eucaryotic flagellum. J. Cell. Biol. 98:789–794, 1984.

Микротрубочки цитоплазмы

11-21

- А. колхицин
- Б. центр организации микротрубочек (МТОС – microtubule-organizing center)
- В. динамическая нестабильность
- Г. белки, ассоциированные с микротрубочками (MAPs – microtubule-associated proteins)
- Д. кинезин

11-22

- А. Правильно.
- Б. Неправильно. Быстро (в течение нескольких минут) блокируются только те клетки, которые в момент добавления колхицина находятся на стадии митоза.
- В. Правильно.
- Г. Правильно.
- Д. Правильно.

- Е. Неправильно. Динамическая нестабильность проявляется только у цитоплазматических микротрубочек с неэкспированными концами.
- Ж. Правильно.
- З. Неправильно. Посттрансляционным модификациям (тирозилированию и ацетилированию) подвергается полимеризованный тубулин; обратные процессы происходят на неполимеризованных субъединицах.
- И. Неправильно. Микротрубочки в аксоне ориентированы лишь в одном направлении. Движение везикул и органелл в обе стороны вероятнее всего достигается благодаря работе двух белковых «моторов», перемещающих частицы в противоположных направлениях.
- К. Правильно.

11-23

- А. Центросомы снижают критическую концентрацию, ибо служат центрами нуклеации для роста микротрубочек. Центры нуклеации облегчают возникновение новых микротрубочек; кроме того, они предохраняют связанный конец от деполимеризации, благодаря чему образовавшаяся микротрубочка имеет больше шансов сохраниться. Если нет таких центров нуклеации, возникновение новых микротрубочек идет гораздо труднее, и оба их конца подвергаются распаду.
- Б. Кривые образования микротрубочек в присутствии и в отсутствие центросом различаются по форме, так как в качестве критериев полимеризации в этих двух случаях использовали разные по своей природе параметры. В отсутствие центросом (рис. 11-17, А) о полимеризации судили по общему количеству образовавшегося полимера, которое зависит только от концентрации добавленного тубулина. Это количество с ростом концентрации тубулина также будет расти — линейно и неограниченно. В присутствии центросом (рис. 11-17, Б) критерием полимеризации служило число микротрубочек, приходящихся на одну центросому. Поскольку число центров нуклеации на каждой центросоме ограничено (примерно по 60 центров в данном эксперименте), при высоких концентрациях тубулина наступает насыщение.
- В. Концентрация димеров тубулина, равная 1 мг/мл, соответствует концентрации тубулина, равной 9,1 мкМ.

$$[\text{тубулин}] = \frac{1 \text{ мг тубулина}}{\text{мл}} \times \frac{\text{ммоль тубулина}}{1,1 \times 10^5 \text{ мг тубулина}} \times \frac{1000 \text{ мл}}{\text{л}} =$$

$$= 9,1 \times 10^{-3} \text{ ммоль/л} = 9,1 \times 10^{-3} \text{ мМ};$$

$$[\text{тубулин}] = 9,1 \text{ мкМ}.$$

Эта величина ниже критической концентрации для сборки микротрубочек в отсутствие центросом. Таким образом, без предоставляемых центросомой точек нуклеации микротрубочек в клетке просто не будет. Вероятно, именно поэтому большинство микротрубочек в животных клетках «выходят» из центросом.

Литература: Mitchison, T.; Kirschner, M. Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes. Nature 312:232-237, 1984.

11-24

- А. Микротрубочки, сборка которых происходит на аксонемах

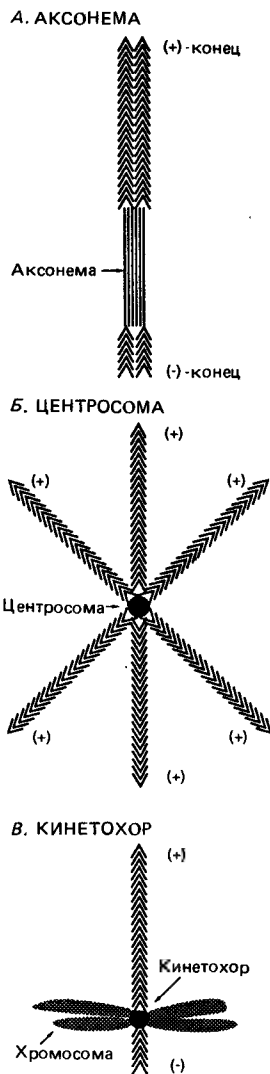


Рис. 11-30. Полярности микротрубочек, нуклеация которых произошла на аксонемах (А), центросомах (Б) и кинетохорах (В) (ответ 11-24).

жгутиков, являются продолжением уже имеющихся в них микротрубочек. Тем самым направление роста четко определено: плюс-конец аксонемы будет центром нуклеации для микротрубочки, плюс-конец которой в свою очередь остается свободным для присоединения новых субъединиц. Таким образом, вновь образованная микротрубочка своим минус-концом присоединена к аксонеме, а плюс-концом направлена от аксонемы (рис. 11-30, А).

- Б. Плюс-концы микротрубочек должны наращиваться быстрее, так как микротрубочки с открытыми плюс-концами (т. е. те, что присоединены к плюс-концу аксонемы) длиннее, чем микротрубочки с открытыми минус-концами (присоединенные к минус-концу аксонемы).
- В. Благодаря тому, что у аксонемы можно различить плюс-и минус-концы, становится очевидным, что скорость наращивания на плюс-концах выше, чем на минус-концах: микротрубочки, соединенные с плюс-концами, длиннее тех, которые соединены с минус-концами. Именно эта разница в скорости сборки и позволяет определить, какова полярность микротрубочек, образующихся на центросомах и кинетохорах.

Длина микротрубочек, нуклеация которых произошла на центросомах, свидетельствует о том, что открыт их плюс-конец. Следовательно, центросомы «организуют» сборку микротрубочек, связывая их минус-концы (рис. 11-11, Б). Для микротрубочек, образующихся на кинетохорах, характерно бимодальное распределение по длине; следовательно, некоторые микротрубочки (те, что длиннее) связаны с кинетохором своими минус-концами, а некоторые (более короткие) — плюс-концами (см. рис. 11-30, В).

Литература: Mitchison, T.; Kirschner, M. W. Properties of the kinetochore *in vitro*. I. Microtubule nucleation and tubulin binding. J. Cell Biol. 101:755 765, 1985.

11-25

- А. Два конца одной микротрубочки, по-видимому, ведут себя совершенно независимо. В то время как один укорачивается, другой может наращиваться, и оба могут укорачиваться или удлиняться одновременно. Кроме того, переходы от удлинения к укорочению и наоборот на обоих концах никак не коррелируют друг с другом.
- Б. Гипотеза GTP-колпачка предсказывает, что быстро растущий конец, имеющий более длинный колпачок, будет стабильнее, чем медленно растущий, у которого колпачок короче. Это означает, что, согласно простой гипотезе GTP-колпачка, быстро удлиняющийся конец должен пребывать в состоянии полимеризации дольше, чем медленно растущий; иначе говоря, на быстро растущем конце переключение между фазами удлинения и укорочения будет происходить реже, чем на медленно удлиняющемся. (Гипотеза ничего не говорит о том, как часто укорачивающийся конец, у которого нет колпачка, может превращаться в растущий.)

Если какие-то экспериментальные результаты на этот счет имеются, то только против предсказаний простой гипотезы GTP-колпачка. Периоды роста на «активных» концах не более длительны (наоборот, они оказываются даже короче), чем на «неактивных». Таким образом, простая гипотеза GTP-колпачка экспериментально не подтверждается; кроме тубулина связы-

ваться с GTP-колпачком и способствовать тем самым устойчивости быстро растущих концов могут и другие белки.

- В. Поскольку нуклеация сборки микротрубочки центросомой происходит путем связывания с минус-концами, все свободные концы микротрубочек — это плюс-концы. Следовательно, все концы должны вести себя однотипно (быть «активными» или «неактивными»). Полагают, что «активные» концы соответствуют плюс-концам, однако специально таких исследований не проводили.

Поскольку свойством стабилизировать микротрубочки (предохранять их от разборки) обладают ассоциированные с ними белки (МАР), следует ожидать, что при их добавлении уменьшится частота переключения между фазами наращивания и распада и увеличится длительность пребывания в фазе полимеризации (роста). Именно это наблюдается в эксперименте. Фактически переключение полностью исчезает, и наращивание происходит равномерно и непрерывно до тех пор, пока не будет достигнуто стационарное состояние, после чего длина микротрубочек сохраняется неизменной.

Литература: Horio, T.; Hotami, H. Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* 321:605–607, 1986.

Промежуточные филаменты

11-26

- А. кератины
- Б. виментин
- В. десмин
- Г. глиальный фибриллярный кислый белок
- Д. нейрофиламенты
- Е. ядерные ламины

11-27

- А. Правильно.
- Б. Неправильно. Промежуточные филаменты крайне плохо растворимы и образуют остаток после экстракции клеток растворами неионных детергентов и солей в высокой концентрации.
- В. Правильно.
- Г. Неправильно. Белки всех цитоплазматических промежуточных филаментов кодируются генами одного мультигенного семейства.
- Д. Правильно.
- Е. Правильно.
- Ж. Неправильно. Некоторые совершенно здоровые, живые клетки, например, те глиальные клетки, которые образуют в центральной нервной системе миелин, полностью лишены цитоплазматических промежуточных филаментов. Однако даже в этих клетках есть ядерные ламины.
- З. Правильно.

11-28

Сегмент ядерного ламина С, обозначенный как виток 1А, «ложится» на гептадный повтор в 9 позициях из 11 (см. рис. 11-31), что считается очень хорошим совпадением. Для образования «витого каната» совпадение не обязательно должно быть полным. Два других отмеченных сегмента (виток 1Б и виток 2,

в разборке ламиновой сети, однако до настоящего доказательства они «не дотягивают». Известно много примеров белков, состояние фосфорилирования которых может меняться без какого-либо видимого влияния на их функции. Необходима более прямая демонстрация того, что фосфорилирование ламин действительно влияет на их сборку и разборку.

Литература: Ottaviano, Y.; Gerace, L. *Prosporylation of the nuclear lamins during interphase and mitosis. J. Biol. Chem.* 260:624–632, 1985.

Организация цитоскелета

11-30

- А. передний край
- Б. контактное ингибирование подвижности
- В. волосковые клетки

11-31

- А. Неправильно. Большинство ферментов можно легко проэкстрагировать из клеток путем обработки последних мягкими детергентами (с целью нарушить целостность мембраны) и буферами, имитирующими по ионному составу цитоплазму. Если бы ферменты в цитозоле были связаны с цитоскелетом, они бы оставались в этих условиях в клетках и не экстрагировались.
- Б. Правильно.
- В. Правильно.
- Г. Правильно.
- Д. Неправильно. Хотя основная доля «возвращаемых» мембранных компонентов в ползущей клетке действительно направляется к ее переднему краю, однако интернализация и другие процессы рециклизации мембраны идут по всей поверхности клетки.

11-32

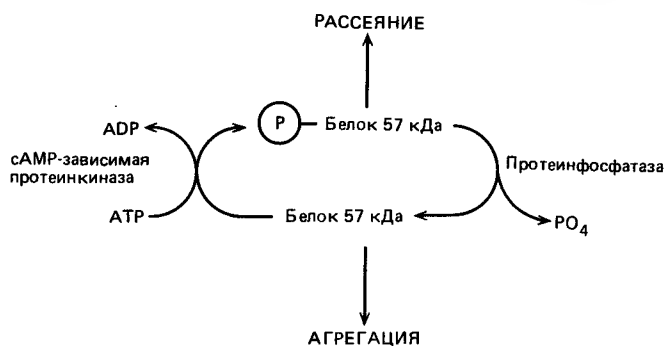
Судя по тому, что все крючки загнуты в одну сторону, все микротрубочки ориентированы в одном направлении. Если бы мы имели дело со смесью противоположно ориентированных микротрубочек, то крючки на некоторых из них были бы загнуты в другую сторону (против часовой стрелки). (Заметим, что не стоит надеяться увидеть такую микротрубочку, у которой одни крючки загнуты в одну сторону, а другие в противоположную.)

11-33

- А. Одна из возможных моделей, описывающих регуляцию рассеяния и агрегации пигмента, изображена на рис. 11-32. Степень фосфорилирования белка 57 кДа меняется в зависимости от уровня сАМР (который в свою очередь контролируется с участием гормональных рецепторов, локализованных в плазматической мембране). В фосфорилированном состоянии этот белок стимулирует рассеяние гранул пигмента, а в дефосфорилированном – их агрегацию. Фосфорилирует его сАМР-зависимая протеинкиназа, дефосфорилирует – протеинфосфатаза.

Схема на рис. 11-32 объясняет все наблюдаемые факты, кроме эффекта АТР-γ-S. Этот аналог АТР может служить субстратом для многих протеинкиназ; вряд ли рассматриваемый случай является исключением. Но поскольку в присутствии АТР-γ-S скорость рассеяния пигмента низка, напрашивается

Рис. 11-32. Возможная модель регуляции для процессов агрегации и рассеяния пигментных гранул (ответ 11-33).



предположение, что либо перенос тиофосфата киназой на белок 57 кДа происходит более медленно, либо тиофосфорилированный белок менее активен, чем «нормально» фосфорилированный белок 57 кДа. Крайне медленная реагрегация пигментных гранул, рассеянных в присутствии АТР- γ -S, свидетельствует о том, что сильно заторможено отщепление тиофосфата от белка 57 кДа фосфатазой.

- Б. Для многих протеинкиназ АТР- γ -S является вполне пригодным субстратом, однако для ферментов, преобразующих свободную энергию гидролиза АТР в движение, таких как динеин ресничек и киназа легких цепей миозина, это соединение субстратом служить не может. Рассеяние гранул пигмента, которое происходит и в присутствии АТР- γ -S, по-видимому, не нуждается в энергии гидролиза АТР. Для агрегации, напротив, гидролиз АТР необходим, и из этого следует, что агрегация должна быть активным процессом.

Литература: Rozdzial, M. M.; Haimo, L. T. Bidirectional pigment granule movements of melanophores are regulated by protein phosphorylation and dephosphorylation. *Cell* 47:1061-1070, 1986.

11-34

- А. При скорости роста 40 мкм/ч за 9 сут будет покрыто расстояние в 9 мм (40 мкм/ч $\times$ 24 ч $\times$ 9 сут), что находится в пределах значений, полученных при измерении скорости перемещения белков по аксону (и примерно соответствует скорости миграции белков нейрофиламентов, см. рис. 11-24).
- Б. Если вы придерживаетесь того мнения, что сборка микротрубочек происходит в теле нейрона, то подавление роста колхицином, добавленным к концу аксона, вы могли бы объяснить его действием на равновесие между полимером и мономерами: добавка колхицина сдвинет равновесие на конце в сторону разборки. В этих условиях происходящая в теле клетки сборка микротрубочек может уравниваться их разборкой на конце аксона. С этой точки зрения тот факт, что нервы перестают расти после воздействия колхицином на их концы, удивления не вызывает, равно как и то, что при более высокой концентрации колхицина аксоны даже укорачиваются.

Однако вы столкнулись бы с огромными трудностями, пытаясь объяснить, почему не оказывает влияния на рост аксонов воздействие колхицином на тело нейрона. Если сборка микротрубочек происходит там, то добавленный к телу клетки колхицин должен блокировать сборку (и останавливать рост аксонов).

- В. Эксперименты с введением меченых аминокислот выявляют наличие медленного потока строительных компонентов, необходимых для роста нерва на его конце, что согласуется с соответствующей моделью. Какая-то часть движущегося по аксону тубулина может, конечно, использоваться для репараций по пути движения, но все же основная его масса должна полимеризоваться в микротрубочки на конце аксона. До сих пор никто еще однозначно не показал, в какой форме находится движущийся по аксону тубулин; нерастворимость его в буферах, содержащих детергент, еще не доказывает, что он движется в составе микротрубочек.
- Г. Две модели по-разному предсказывают характер движения. В соответствии с моделью сборки в теле клетки расстояние между телом клетки и меченым участком должно равномерно увеличиваться, а расстояние между меченым участком и растущим концом — оставаться неизменным. Согласно модели роста на конце, сегмент, содержащий метку, будет двигаться по аксону, пока не достигнет его конца, где он включится в состав микротрубочек и останется в этом месте, на фиксированном расстоянии от тела нервной клетки; растущий же конец будет продолжать двигаться вперед, так что расстояние между ним и меченым сегментом будет все время увеличиваться.

Как ни странно, эта фундаментальная проблема клеточной биологии еще ждет своего решения; согласия в вопросе о том, какая из двух моделей верна (и верна ли какая-то из них), пока нет.

Литература: Lasek, R. J.; Hoffman, P. N. The neuronal cytoskeleton, axonal transport and axonal growth. In *Cell Motility* (R. Goldman, T. Pollard, J. Rosenbaum, eds.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1976.

Bamburg, J. R.; Bray, D.; Chapman, K. Assembly of microtubules at the tip of growing axons. *Nature* 321:788–790, 1986.

Bamburg, J. R.; Bray, D.; Chapman, K. Microtubule assembly in the axon. *Nature* 323:400, 1986.

Solomon, F. Microtubule assembly in the axon. *Nature* 322:599, 1986.

**Три системы химической сигнализации:
эндокринная, паракринная и синаптическая**

12-1

- А. гормоны
- Б. паракринная регуляция
- В. нейромедиаторы
- Г. гипоталамус
- Д. простагландины

12-2

- А. Правильно.
- Б. Правильно.
- В. Правильно.
- Г. Неправильно. Гормоны удаляются из кровотока главным образом в результате связывания их с клетками-мишенями.
- Д. Неправильно. Одна и та же сигнальная молекула может действовать разными путями. Ацетилхолин, например, в нервно-мышечном синапсе стимулирует мышечное сокращение (выступает как нейромедиатор), а в сердце, действуя по паракринному типу, угнетает сократительный ответ сердечной мышцы.
- Е. Неправильно. Стимуляция одного и того же рецептора может вызывать различные ответы в зависимости от типа клетки-мишени. Это связано с другими различиями в путях передачи сигнала либо с особенностями внутриклеточных белков-мишеней, которые активируются или ингибируются.
- Ж. Неправильно. Выброс инсулина, как и других пептидных гормонов, происходит за счет его внутриклеточных запасов, и для этого не требуется синтеза новой РНК или белка. Реакция развивается медленно, потому что так протекают процессы диффузии и распространения гормона с кровотоком.
- З. Правильно.
- И. Правильно.

12-3 При освобождении ацетилхолина из нейрональных синаптических пузырьков часть его молекул «находит» свои рецепторы и связывается с ними, часть диффундирует в окружающее пространство, но большинство быстро гидролизует до холина и ацетата, которые вновь поглощаются нервными окончаниями. При снижении плотности рецепторов уменьшается вероятность того, что молекула ацетилхолина успеет связаться с рецептором прежде, чем произойдет ее гидролиз. Такая недостаточная (субоптимальная) передача сигнала является причиной мышечной слабости у больных миастенией. Один из способов преодоления этой слабости

заключается в том, чтобы скомпенсировать уменьшение числа рецепторов, повысив концентрацию ацетилхолина в синаптической щели при стимуляции. Достичь этого можно в принципе двумя путями: либо усилив выброс ацетилхолина нервными окончаниями, либо подавив его гидролиз. Неостигмин ингибирует фермент ацетилхолинэстеразу, ответственный за гидролиз ацетилхолина в синаптической щели, и тем самым повышает эффективность синаптической передачи. (Вы могли бы предположить, что неостигмин связывается с ацетилхолиновыми рецепторами и прямо стимулирует мышечное сокращение. Однако если бы дело обстояло так, то инъекция неостигмина приводила бы к сокращению всех скелетных мышц, а не к координированным движениям.)

Литература: Rowland, L. P. Diseases of chemical transmission at the nerve-muscular synapse: myasthenia gravis. In Principles of Neural Science, 2d ed. (E. R. Kandel, J. H. Schwartz, eds.), pp. 147-185. New York: Elsevier, 1985.

- 12-4** Сукцинилхолин, связываясь с ацетилхолиновым рецептором очень прочно, не вызывает, однако, его конформационного изменения, которое необходимо для открывания ионного канала и запуска мышечного сокращения. При этом сукцинилхолин препятствует нормальному сокращению мышц, конкурируя с ацетилхолином за связывание с рецептором и блокируя таким образом действие ацетилхолина на мышцу. По этой причине сукцинилхолин относят к *антагонистам* ацетилхолина.

12-5

- A.** Концентрацию инсулина в каждой из проб можно определить непосредственно по калибровочной кривой:

Проба 1	1,1 пг/мл,
Проба 2	6,1 пг/мл,
Проба 3	2,7 пг/мл.

- B.** Участок кривой, где точность определения наибольшая, расположен между значениями 0,4 и 0,7 отношения (связанный лиганд)/(свободный лиганд). При отношении ниже 0,4 кривая становится слишком пологой, т.е. большие изменения в концентрации инсулина вызывают малые изменения в величине этого отношения.
- B.** Описанный метод определения человеческого инсулина работает и в том случае, если антитела получены против свиного инсулина (при условии, что для получения этих антител иммунизировали животное, а не человека). Коль скоро свиной и человеческий инсулины обладают структурным сходством (имеют общие антигенные детерминанты), так что антитела против свиного инсулина реагируют с человеческим — метод пригоден для измерения концентрации инсулина человека. Правильность результатов, получаемых с помощью РИА, решающим образом зависит от того, одинаково ли ведут себя антиген в стандартных образцах и антиген в определяемых пробах. В рассматриваемом примере и анализируемый, и стандартный образец — это человеческий инсулин, поэтому метод можно применять. (Если бы антитела для этого метода были получены от человека, они узнавали бы в основном ту часть свиного инсулина, которая отличает его от человеческого. Такие антитела практически не связывались бы с инсулином человека, и метод оказался бы непригодным.)

Литература: Yalow, R. S. Radioimmunoassay: a probe for the fine structure of biologic systems. Science 200, 1236-1245, 1978

12-6

- А. Поскольку период полураспада радиоактивного йода составляет 7 сут, каждые два его атома будут давать в среднем один распад в неделю. Чтобы узнать требуемое количество меченого инсулина в пикограммах, надо перевести величину 1000 имп/мин в число распадов за неделю (и умножить на два, чтобы получить число атомов радиоактивного йода), а затем вычислить массу для такого же количества молекул инсулина.

1000 имп/мин составляет $2,0 \times 10^7$ распадов (расп.) в неделю:

$$\frac{\text{расп.}}{\text{нед}} = \frac{1000 \text{ имп}}{\text{мин}} \times \frac{2 \text{ расп.}}{\text{имп}} \times \frac{60 \text{ мин}}{\text{ч}} \times \frac{24 \text{ ч}}{1 \text{ сут}} \times \frac{7 \text{ сут}}{\text{нед}} =$$

$$= 2,0 \cdot 10^7 \text{ расп./нед.}$$

Таким образом, 1000 имп/мин соответствует 4×10^7 атомов радиоактивного йода. Масса такого же количества молекул инсулина будет равна 0,76 пг:

$$\text{Инсулин} = 4 \times 10^7 \text{ молекул} \times \frac{\text{моль}}{6 \times 10^{23} \text{ молекул}} \times \frac{11\,466 \text{ г}}{\text{моль}} \times$$

$$\times \frac{10^{12} \text{ пг}}{\text{г}} = 0,76 \text{ пг}$$

- Б. Чувствительность радиоиммунного определения наиболее высока, когда количества меченого и определяемого веществ в пробе равны. Следовательно, при указанных допущениях минимальное количество немеченого инсулина, которое можно обнаружить, — 0,76 пг.

- 12-7 Выявление во внутриклеточных каплях предварительно помеченного материала из просвета фолликула означает, что эти капли состоят из материала просвета, поглощенного фолликулярными клетками. Перемещение внутриклеточных капель с периферии вглубь клетки также согласуется больше с поглощением материала, чем с его секрецией. Наличие у фолликулярного тиреоглобулина маннозо-6-фосфатного остатка позволяет думать, что поглощенный материал маркируется для направления в лизосомы, где тиреоглобулин расщепляется с образованием тироксина. Механизм высвобождения тироксина в кровоток неизвестен. Схема, суммирующая данные о синтезе и высвобождении тироксина, изображена на рис. 12-17.

Заметим, что присутствие в молекуле тиреоглобулина остатка маннозо-6-фосфата поднимает весьма любопытную проблему клеточной биологии. Почему тиреоглобулин не попадает сразу в лизосомы, а вначале секретируется в просвет фолликула? Ответа на этот вопрос пока нет. Во всяком случае фосфорилирование манноз протекает, видимо, по обычному механизму. Возможно, маннозо-6-фосфатный сигнал могут маскировать другие модификации белка, например присоединение сульфатированных тирозинов или большого количества остатков сиаловых кислот, и это позволяет тиреоглобулину секретироваться. Другие внеклеточные модификации молекулы (в том числе, вероятно, и само йодирование), могут усиливать маннозо-6-фосфатный сигнал, так что после возвращения в клетку из просвета фолликула тиреоглобулин уже попадает в лизосомы.

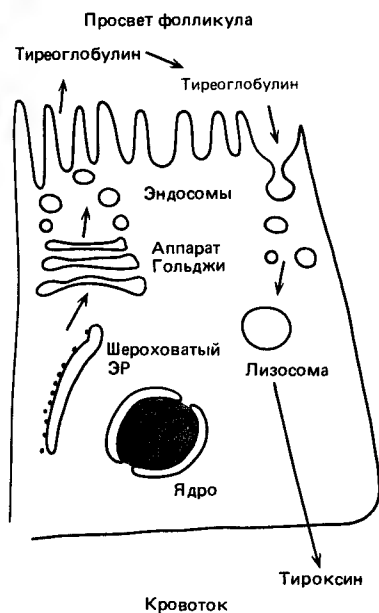


Рис. 12-17. Синтез и высвобождение тироксина (ответ 12-7).

Литература: Herzog, V.; Neumuller, W.; Holzmann, B. Thyroglobulin, the major and obligatory exportable protein of thyroid follicle cells, carries the lysosomal recognition marker mannose 6-phosphate. EMBO J. 6,555–560, 1987.

Сигнализация с участием внутриклеточных рецепторов: механизмы действия стероидных гормонов

12-8

- А. стероидные гормоны
- Б. активация рецептора
- В. экдизон
- Г. синдром тестикулярной феминизации

12-9

- А. Неправильно. Стероидные гормоны не являются белками, тем более ДНК-связывающими белками. Такими белками являются все до сих пор выявленные *рецепторы* стероидных гормонов.
- Б. Правильно.
- В. Правильно.
- Г. Неправильно. Для каждого из этих гормонов – эстрадиола, кортизола и прогестерона – в клетке есть свой специфический рецептор. Каждый рецептор кодируется собственным геном.
- Д. Правильно.

12-10

- А. Обе клеточные линии, по-видимому, содержат рецептор глюкокортикоидов, что следует из повышения активности САТ после обработки дексаметазоном. При трансфекции гибридного гена, несущего чувствительный к глюкокортикоидам энхансер в сегменте вирусной ДНК, активность САТ в присутствии дексаметазона возросла в клеточной линии 1 в 5 раз, а в линии 2 – в 8 раз.
- Б. Клеточная линия 1 достоверно отличается от клеточной линии 2 по уровню активности САТ в *отсутствие* дексаметазона после трансфекции гибридного гена, содержащего чувствительный к глюкокортикоидам энхансер. Есть два разумных объяснения этого различия: 1) клеточная линия 1 несет мутантный рецептор глюкокортикоидов, который может частично активировать глюкокортикоидный энхансер в вирусном сегменте в отсутствие глюкокортикоидов; 2) клеточная линия 1 содержит тканеспецифический белок, который узнает и активирует второй (нечувствительный к глюкокортикоидам) энхансер вирусного сегмента.
- В. Эти два возможных объяснения позволяют по-разному предсказать результаты экспериментов, в которых разнообразные более короткие вирусные сегменты тестировали по активности САТ в обеих линиях. Если разница между двумя клеточными линиями была следствием различий в глюкокортикоидных рецепторах, узнающих один и тот же энхансер, то все более короткие вирусные сегменты должны обладать одним из двух следующих свойств: 1) не нести глюкокортикоидный энхансер и не активироваться дексаметазоном ни в одной из линий либо 2) нести глюкокортикоидный энхансер и давать точно такую же дифференциальную реакцию на дексаметазон, какую обнаруживает интактный вирусный сегмент.

С другой стороны, если различие между линиями клеток определялось различными элементами энхансеров (чувствительными и нечувствительными к глюкокортикоидам), то различные энхансеры могли бы оказаться в разных сегментах ДНК. Сегменты, которые несут только глюкокортикоидный энхансер, вызывали бы одинаковые ответы в обеих линиях, а те сегменты, которые несут только нечувствительный к глюкокортикоидам энхансер, должны были бы индуцировать активность САТ в линии 1 (которая является глюкокортикоиднезависимой), но не в линии 2.

В действительности результаты таких экспериментов свидетельствуют о том, что вирусный сегмент содержит второй энхансер, который специфически активизируется в клеточной линии 1. В сходных экспериментах показано, что тканеспецифический контроль активности генов может осуществляться путем взаимодействия многих регуляторных факторов. Так, для активации экспрессии генов стероидами требуется обычно, чтобы реагирующая клетка имела рецептор стероидов и чтобы структура хроматина вокруг потенциально регулируемого гена была «открытой» — состояние, которое достигается при действии других факторов транскрипции.

Литература: DeFranco, D.; Yamamoto, K.R. Two different factors act separately or together to specify functionally distinct activities at a single transcriptional enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 6, 993–1001, 1986.

12-11

- А. Чувствительные к глюкокортикоидам элементы расположены в LTR главным образом между нуклеотидами — 240 и — 50. По данным электрофореза видно, что в исходной смеси все фрагменты из мутантных LTR вначале представлены поровну. После связывания рецептора состав смеси изменился: фрагмента с делецией до — 240 осталось практически столько же, сколько и фрагмента из целого LTR, фрагменты с делецией до — 50 или до + 50 полностью отсутствуют, фрагменты же с делецией до — 202 или до — 137 присутствуют в промежуточном количестве. Наблюдаемый «градиент» связывания дает основание предположить, что несколько чувствительных к глюкокортикоидам элементов расположено между нуклеотидами — 240 и — 50. Это предположение подтверждается экспериментальными данными, которые суммированы в пункте Б.
- Б. Обобщенную последовательность для связывания рецептора глюкокортикоидов можно «вычислить», сравнив частоты появления G, C, A и T в каждом положении связывающихся последовательностей, как это показано на рис. 12-18. Индивидуальные нуклеотиды, присутствующие на данном месте более чем в половине последовательностей, приведены сразу под частотами. В литературе сообщалось о двух обобщенных последовательностях, связывающихся с рецептором глюкокортикоидов (AGAA/TCAGT/A и AGAACA).

Литература: Payvar, F.; DeFranco, D.; Firestone, G. L.; Edgar, B.; Wrange, O.; Okret, S.; Gustafsson, J.-A.; Yamamoto, K. R. Sequence-specific binding of glucocorticoid receptor to MTV DNA at sites within and upstream of the transcribed region. *Cell* 35, 381–392, 1983.

Scheidereit, C.; Geisse, S.; Westphal, H. M.; Beato, M. The glucocorticoid receptor binds to defined nucleotide sequences near the promoter of mouse mammary tumor virus. *Nature* 304, 749–752, 1983.

Рис. 12-18. Частота встречаемости G, C, A и T в каждом из положений связывающихся последовательностей (ответ 12-11). Звездочкой (*) отмечены нуклеотиды, встречающиеся в 10 и более последовательностях. В первой обобщенной последовательности показаны те основания, которые представлены в данном положении более чем в половине из 11 последовательностей данного набора; там, где указаны два основания, нижнее тоже часто встречается в данном положении.

1.	C	C	A	A	G	A	G	G	G	A	C	A	G	T	G	G	C	T	G	G	A	C	T	A	A	T	A	G							
2.	G	G	A	C	T	A	A	T	A	G	A	A	C	A	T	T	A	T	T	C	T	A	C	C	A	A	A	A	C	T					
3.	T	C	G	A	T	T	T	A	A	G	A	A	C	A	G	T	T	T	G	T	A	C	C	C	A	A	A	A	A	C	G				
4.	A	G	G	A	T	G	T	G	A	G	A	C	A	A	G	T	T	G	T	T	A	C	C	T	G	A	A	C	T	C	G				
5.	A	G	G	A	A	A	T	A	G	A	A	C	A	C	A	C	T	C	A	G	C	T	C	T	G	A	G	A	C	T	C	A			
6.	C	A	G	A	G	C	T	C	A	G	A	T	C	A	G	A	A	C	A	C	G	T	T	C	T	G	A	T	A	C	C	A	A		
7.	C	A	T	G	A	T	T	C	A	G	C	A	C	A	A	A	A	G	A	G	C	G	T	G	T	G	T	G	C	C	A	C	A		
8.	C	T	G	T	T	A	T	T	A	G	G	A	C	A	T	C	G	T	C	C	A	G	C	C	T	T	C	C	A	G	G	A	C	A	
9.	C	C	T	A	G	T	G	T	A	G	A	T	C	A	G	T	C	A	G	A	T	C	A	G	A	T	C	A	G	A	T	T	A	A	A
10.	G	A	T	C	A	G	T	C	A	G	A	T	C	A	G	A	T	T	A	A	A	A	G	C	T	T	A	A	A	A	A	A	A	G	T
11.	T	T	C	C	A	A	A	T	A	G	A	T	C	C	T	T	T	T	T	G	C	T	T	T	T	A	A	A	T	C	T				
A	2	3	2	5	4	4	4	1	*	0	8	6	1	*	1	3	3	3	1	4	2	2	2	2	5	8	6	4	6	4					
C	5	3	1	3	0	1	0	3	0	0	1	1	*	1	1	1	2	1	3	2	1	5	3	5	1	0	2	2	4	2					
G	2	3	5	1	3	3	1	2	1	*	2	0	0	0	6	0	3	2	4	1	3	1	3	1	3	1	2	1	2	1	0	3			
T	2	2	3	2	4	3	6	5	0	0	0	4	0	0	3	7	3	5	3	4	5	3	3	3	3	2	1	4	1						

Обобщенная
последовательность T A G A A C A G T
A T A C

12-12

- A. Вызываемое циклогексимином изменение в картине образования пufов обусловлено его действием на синтез белка. Этот результат указывает на то, что для «выключения» ранних пufов и «включения» поздних необходим новосинтезированный белок. Вероятно, этот белок должен быть продуктом гена, находящегося в одном из ранних пufов.

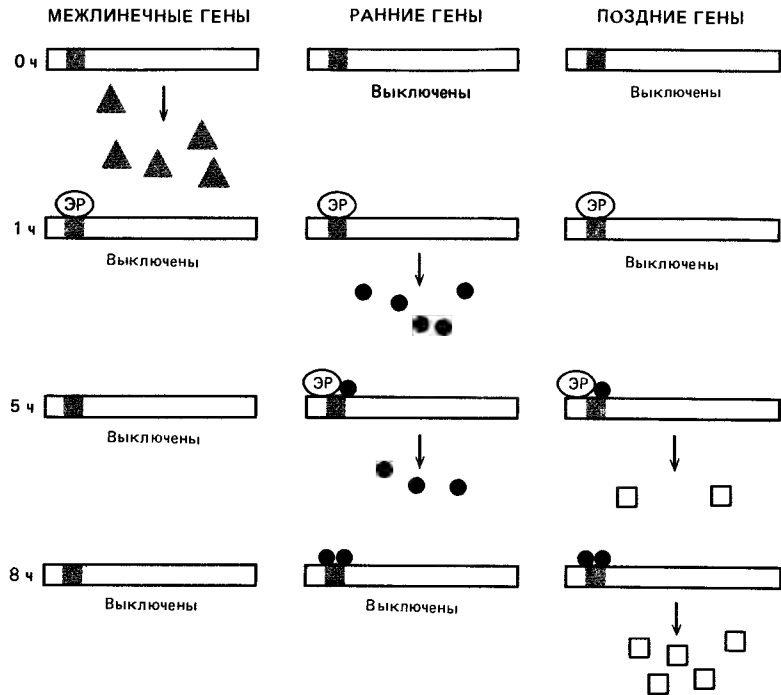
Транскрипция межлинейных пufов нечувствительна к обработке циклогексимином. Можно предположить, что эти пufы «выключаются» непосредственно под действием комплекса рецептора с экдизоном. (По-видимому, выключение опосредуется белком, поскольку сам экдизон недостаточно велик, чтобы вступать в специфические взаимодействия непосредственно с ДНК.)

- B. Немедленное уменьшение ранних пufов после удаления экдизона указывает на то, что для поддержания этих генов в активном состоянии требуется постоянное присутствие комплекса экдизон-рецептор.

Преждевременная активация поздних пufов в этих условиях — результат неожиданный. Если бы активация поздних пufов зависела только от продуктов ранних пufов, они должны были бы включаться в то же время, что и обычно (или даже с некоторой задержкой из-за низкого уровня «раннего» продукта). Преждевременная активация указывает на то, что комплекс экдизон-рецептор в действительности действует как ингибитор, подавляя активацию до того момента, пока концентрация предполагаемого «раннего» продукта не достигнет некоторого критического уровня. Удаление экдизона способствует индукции пufов при более низкой концентрации «раннего» продукта.

- B. Эти наблюдения представлены в виде схемы на рис. 12-19. Комплекс экдизон-рецептор связывается с регуляторными участками как межлинейных, так и ранних и поздних пufов. В межлинейных пуфах связывание вызывает их выключение, в ранних пуфах связывание вызывает их включение, а поздние пufы поддерживаются за счет связывания в выключенном (неактивном) состоянии. Продукт одного или нескольких ранних пufов связывается с регуляторными участками ранних и поздних пufов, что приводит в конечном итоге к выключению ранних пufов и включению поздних.

Рис. 12-19. Схема, иллюстрирующая связь между присоединением комплекса экдизон-рецептор (ЭР) и активностью генов (ответ 12-12).



Литература: Ashburner, M.; Chihara, C.; Meltzer, P.; Richards, G. Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 655–662, 1973.

Механизмы передачи сигналов белками-рецепторами клеточной поверхности

12-13

- А. каналобразующие
- Б. каталитические
- В. сопряженные с G-белками
- Г. внутриклеточные посредники (внутриклеточные медиаторы)
- Д. аденилатциклаза; фосфодиэстераза сAMP
- Е. G-белки
- Ж. холерный токсин
- З. ингибиторный G-белок (G_i -белок)
- И. Ca^{2+} -запасяющая органелла
- К. фосфатидилинозитол (PI)
- Л. инозитолтрисфосфат ($InsP_3$)
- М. протеинкиназа С (С-киназа)
- Н. gas-белки
- О. тирозин-специфичная протеинкиназная

12-14

- А. Правильно.
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. Гликогенфосфорилаза – это фермент, расщепляющий гликоген с образованием глюкозо-1-фосфата. Он использует в качестве фосфорилирующего агента неорганический фосфат, а не АТФ, почему и называется фосфорилазой, а не киназой.

- Г. Правильно.
- Д. Правильно.
- Е. Правильно.
- Ж. Правильно.
- З. Правильно.
- И. Неправильно. Фосфолипаза С действует путем высвобождения фосфорных эфиров инозитола из фосфоинозитидов. Предполагается, что InsP_3 вызывает поступление Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ в цитоплазму.
- К. Неправильно. Протеинкиназа С активируется диацилглицеролом и ионами Ca^{2+} . InsP_3 не оказывает прямого воздействия на этот фермент.
- Л. Правильно.
- М. Правильно.
- Н. Правильно.
- О. Неправильно. В отличие от онкогенов *erbA*, *erbB* и *neu*, которые кодируют измененные рецепторы, онкоген *sis* кодирует не рецептор, а сам функционально активный PDGF.

12-15

- А. Кривую специфического связывания можно получить путем вычитания кривой неспецифического связывания из кривой общего связывания. Как видно из рис. 12-20, плато на кривой специфического связывания достигается при концентрации альprenолола, близкой к 4 нМ. При более высоких концентрациях β -адренергические рецепторы насыщены альprenололом.
- Б. На один эритроцит лягушки приходится 1500 β -адренергических рецепторов. Поскольку с одним рецептором связывается одна молекула альprenолола, число связанных молекул альprenолола равно числу рецепторов. 1 мг эритроцитарных мембран связывает при насыщении 20 000 имп./мин альprenолола (рис. 12-20). Следовательно, количество связанного альprenолола будет равно:

$$\begin{aligned} \text{Связанный альprenолол} &= \frac{20 \times 10^3 \text{ имп./мин}}{\text{мг}} \times \frac{\text{ммоль}}{10^{13} \text{ имп./мин}} \times \\ &\times \frac{6 \times 10^{20} \text{ молекул}}{\text{ммоль}} \times \frac{\text{мг}}{8 \times 10^8 \text{ эритроцитов}} = 1500 \text{ молекул на} \\ &\text{эритроцит.} \end{aligned}$$

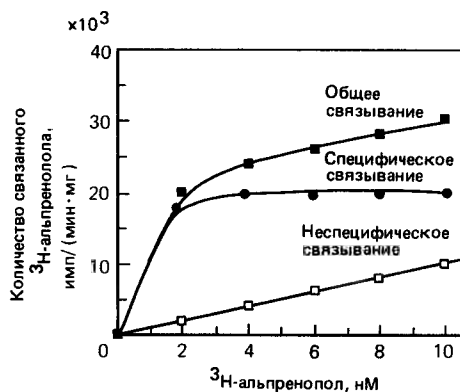


Рис. 12-20. Специфическое связывание альprenолола с мембранами эритроцитов (ответ 12-15).

Поскольку связывание альprenолола с β -адренорецептором происходит эквимольно, то на один эритроцит приходится 1500 β -адренергических рецепторов.

Литература: Lefkowitz, R. J.; Limbird, L. E.; Mukherjee, C.; Caron, M. G. The β -adrenergic receptor and adenylate cyclase. *Biochim. Biophys. Acta* 457, 1-39, 1976.

12-16

- А. На один моль общего родопсина связывалось 5,5 ммоль GppNp при том, что активировалось лишь 0,0011% всего родопсина, т.е. 5,5 ммоль связанного GppNp приходилось на 0,011 ммоль активированного родопсина. Иначе говоря, одна молекула активированного родопсина активировала 500 молекул трансдуцина (5,5 ммоль/0,011 ммоль). Этот эксперимент показывает, что первая ступень усиления при зрительном возбуждении состоит в действии активированного родопсина на трансдуцин. Данный расчет говорит также о том, что дополнительное усиление сигнала при взаимодействии трансдуцина с фосфодиэстеразой cGMP очень незначительно.
- Б. Из приведенной оценки сродства следует, что комплекс трансдуцин-GDP связывается с активированным родопсином, а комплекс трансдуцин-GTP освобождается из связи с ним, и благодаря этому активированный родопсин может взаимодействовать со многими молекулами трансдуцина (как и ожидалось на основании установленного механизма усиления). Прочное связывание комплекса трансдуцин-GTP с фосфодиэстеразой cGMP указывает на то, что активация осуществляется стехиометрически: одна молекула активированного трансдуцина активирует одну молекулу фосфодиэстеразы.

Литература: Fung, B. K.-K.; Stryer, L. Photolyzed rhodopsin catalyzes the exchange of GTP for bound GDP in retinal rod outer segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2500-2504, 1980.

Fung, B. K.-K.; Hurley, J. B.; Stryer, L. Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 152-156, 1981.

12-17

- А. Открывание K^+ -каналов в присутствии GppNp и в отсутствие ацетилхолина может вызвать удивление, ведь освобождение GDP и связывание GTP G-белком в норме стимулируется активированным рецептором. Однако даже в отсутствие активированного рецептора G-белок способен обменивать связанные нуклеотиды на нуклеотиды из цитоплазмы. Этот обмен происходит медленно, и связанный GTP в отсутствие активированного рецептора быстро гидролизует, из-за чего канал остается закрытым. В присутствии GppNp K^+ -каналы медленно открываются, потому что при каждом акте освобождения GDP и связывания GppNp соответствующий G-белок переходит в активную форму. За минуту накапливается достаточно активированного таким путем G-белка, чтобы K^+ -каналы открылись и без ацетилхолина.
- Б. В отсутствие ацетилхолина целый G-белок (гетеротример) не активирует K^+ -канал, по-видимому, из-за того, что, как и в других G-белках, его «активная» часть ингибируется одной из субъединиц. Способность субъединицы $G_{\beta\gamma}$ открывать K^+ -канал в отсутствие ацетилхолина и GTP дает основание считать, что она и есть активная часть G-белка в этом процессе. Это

довольно неожиданный вывод, т.к. за стимуляцию аденилат-циклазы в других клетках ответственна G_α -субъединица.

Как обычно бывает, когда какие-то новые данные ставят под сомнение общепринятые научные представления, эти результаты вызвали оживленные споры, которые не утихают до сих пор (см. литературу). Возможно, на результаты повлияли некие незначительные артефакты, возникшие из-за недостатков в способе постановки эксперимента, поэтому они не вполне адекватно отражают регуляцию K^+ -каналов в сердце. В конце концов вопрос решится в ходе дальнейших экспериментов, и эти выводы будут приняты или отвергнуты. В любом случае наше понимание механизмов клеточной сигнализации только выигрывает.

В. Эти эксперименты практически исключают вероятность участия внутриклеточного посредника в активации K^+ -канала. Поскольку буфер не содержит АТФ или Ca^{2+} , ни один из этих потенциальных медиаторов не может быть вовлечен в открывание K^+ -каналов. То же самое можно сказать о диацилглицероле и $InsP_3$, по крайней мере имея в виду обычные механизмы их действия. Хотя оба этих вещества и могли бы образоваться, однако ни одно из них не может действовать обычным путем. $InsP_3$ в норме влияет на концентрацию Ca^{2+} (чего здесь он делать не может), а диацилглицерол активирует протеинкиназу С (для действия которой необходим АТФ). Простейшая интерпретация этих данных состоит в том, что активация K^+ -каналов $G\beta\gamma$ -субъединицей происходит напрямую, хотя нельзя исключить и участия в активации некоторых других компонентов мембраны.

Г. Упрощенная схема активации K^+ -канала ацетилхолином с участием G-белка показана на рис. 12-21.

Литература: Logothetis, D. E.; Kurachi, Y.; Galper, J.; Neer, E. J.; Clapham, D. E. The $\beta\gamma$ subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K^+ channel in heart. *Nature* 325, 321-326, 1987.

Birnbaumer, L.; Brown, A. M. G protein opening of K^+ channels. *Nature* 327, 21, 1987.

Logothetis, D. E.; Kurachi, Y.; Galper, D.; Neer, E. J.; Clapham, D. E. G protein opening of K^+ channels. *Nature* 327, 22, 1987.

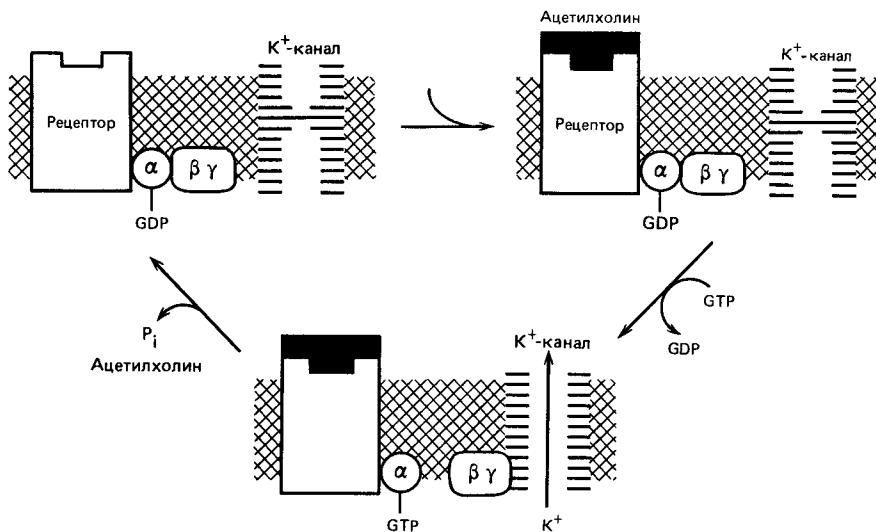


Рис. 12-21. Схема, иллюстрирующая активацию ацетилхолином K^+ -каналов в сердце (ответ 12-17).

12-18

- А. Результаты, изложенные в пунктах 1, 2 и 3, могут получаться при обоих предполагаемых способах высвобождения арахидоновой кислоты, но наблюдения 4 и 5 позволяют разграничить их. Если источник арахидоновой кислоты – расщепление диацилглицерола, образующегося одновременно с инозитолфосфатом, то в обоих экспериментах образование арахидоновой кислоты должно идти параллельно накоплению последнего, в частности оно должно подавляться при обработке ингибитором фосфолипазы С (когда образование диацилглицерола прекращается) и быть нечувствительным к коклюшному токсину (который, по-видимому, не влияет на выход диацилглицерола).
- Б. Наблюдения 1 и 2 свидетельствуют о том, что на освобождение арахидоновой кислоты влияют α_1 -адренергические рецепторы. Стимуляция выброса арахидоновой кислоты с помощью GTP- γ -S указывает на участие в этом процессе G-белка; подавление образования арахидоновой кислоты коклюшным токсином подтверждает это. Однако токсин-чувствительный G-белок, по-видимому, нетождествен тому белку, который активирует фосфолипазу С, поскольку на ее активацию коклюшный токсин не влияет. В то же время эти эксперименты не проясняют связь между G-белком и фосфолипазой A_2 .

Литература: Burch, R. M.; Luini, A.; Axelrod, J. Phospholipase A_2 and phospholipase C are activated by distinct GTP-binding proteins in response to α_1 -adrenergic stimulation in FRTL5 thyroid cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 7201–7205, 1986.

Механизмы действия циклического АМР и ионов кальция

12-19

- А. сАМР-зависимая протеинкиназа (А-киназа)
Б. кальмодулин
В. кальмодулин-зависимые протеинкиназы (Са-киназы)
Г. гуанилатциклаза

12-20

- А. Неправильно. Повышенное содержание сАМР в мышечных клетках способствует расщеплению гликогена и подавлению его синтеза.
Б. Правильно.
В. Правильно.
Г. Неправильно. Ферменты, удаляющие фосфатные группы из белков, называются фосфатазами. Фосфорилазы разрывают связи, присоединяя фосфат (аналогично гидролазам, которые разрывают связи, присоединяя воду).
Д. Правильно.
Е. Правильно.
Ж. Правильно.
З. Неправильно. Во всех клетках содержатся протенинфосфатазы, которые в конце концов выключат эту киназу.

12-21

- А. Если бы А-киназа была в клетках хомячка необходимым ферментом, то невозможно было бы получить мутанты, лишенные активности А-киназы, – они были бы нежизнеспособны. Следо-

вательно, в этих клетках А-киназа незаменимым ферментом не является (точно так же, как и в ряде других клеточных линий, для которых были получены аналогичные мутанты). Однако из этого не следует, что без А-киназы может обойтись и целый организм. Существует множество примеров того, как дефект фермента, имеющий минимальные последствия для клеток в культуре, оказывался весьма тяжелым для целого организма.

- Б. Мутации, приводящие к элиминации каталитической субъединицы, делают клетки нечувствительными к высоким концентрациям сАМР, и, следовательно, резистентными к сАМР. Эти мутации рецессивные, поскольку в присутствии каталитической субъединицы дикого типа чувствительность к сАМР у них восстанавливается. (Может казаться, что мутации, элиминирующие регуляторные субъединицы, будут приводить к таким же эффектам. Однако в отсутствие регуляторных субъединиц А-киназа будет активна постоянно, что приведет к летальным последствиям: избыток А-киназной активности является причиной гибели клеток при высоких концентрациях сАМР. Таким образом, клеточные линии без регуляторных субъединиц просто нельзя было получить.)

Несколько труднее объяснить доминантные мутации. В общем доминантность указывает на измененную активность, а не на полную ее потерю. Доминантные мутации были обнаружены и в регуляторных, и в каталитических субъединицах. Возможная доминантная мутация в регуляторной субъединице — это та, которая увеличивает сродство к каталитической субъединице. Такой мутант может реагировать только на повышенный уровень сАМР (необходимый для вытеснения прочно связанной регуляторной субъединицы). Доминантность мутации будет обусловлена тем, что мутантные регуляторные субъединицы, связываясь с каталитическими при низких концентрациях сАМР, вытесняют нормальные регуляторные субъединицы.

Еще труднее объяснить доминантные мутации в каталитической субъединице. Возможно, мутантные каталитические субъединицы связываются с регуляторными более прочно, изменяя чувствительность киназы как целого к сАМР. Такая мутация будет выявляться как доминантная в том случае, если при соединении мутантной каталитической субъединицы с нормальной каталитической субъединицей образуется гетеродимер, который связывается с регуляторной субъединицей так же, как мутантный. При этом смесь из равных количеств мутантных и нормальных каталитических субъединиц будет проявлять А-киназную активность на уровне $1/4$ от нормальной А-киназной активности (только $1/4$ часть каталитических димеров будет состоять из двух каталитических субъединиц дикого типа).

- В. Приведенные результаты в целом подтверждают мнение (пока еще спорное), что все эффекты сАМР реализуются с участием А-киназы, но для доказательства этой гипотезы данных недостаточно. В сходных работах, где использовались другие линии клеток, также были выделены мутанты по А-киназе. В клетках, полностью лишенных А-киназы, не наблюдается ни один из обычных эффектов сАМР. Таким образом, на сегодня нет данных, которые доказывали бы, что в эукариотических клетках существует какая-то мишень для действия сАМР, отличная от А-киназы.

Литература: *Gottesman, M. M. Genetics of cyclic-AMP-dependent protein kinases. In Molecular Cell Genetics (M. M. Gottesman, ed.), pp. 711–743. New York: Wiley, 1985.*

12-22

- А. Разница в поведении киназы легких цепей миозина, выделенной в присутствии и в отсутствие ингибиторов протеаз, позволяет думать, что регуляторный домен киназы чувствителен к расщеплению протеазами клеточного экстракта. Поскольку именно регуляторный домен должен взаимодействовать с кальмодулином, то неудивительно, что лишенная регуляторного домена киназа на колонке с кальмодулином не задерживается. В свою очередь, активация киназы вследствие протеолитического удаления (или разрушения) регуляторного домена дает основание заподозрить, что этот домен каким-то образом «закрывает» активный центр. При связывании комплекса Ca^{2+} –кальмодулин эта регуляторная «заслонка» открывается и киназа начинает работать. Такие регуляторные заслонки, прикрывающие активный участок, распространены, по-видимому, достаточно широко.
- Б. Ионы Ca^{2+} , проникнув в цитоплазму, связываются с кальмодулином и вызывают изменение его конформации. Комплекс Ca^{2+} –кальмодулин связывается с регуляторным участком киназы легких цепей миозина, «освобождая» ее активный центр. Активированная киназа фосфорилирует легкие цепи миозина, которые при этом тоже меняют свою конформацию; теперь они могут взаимодействовать с актином и инициировать таким образом сокращение. Можно предположить, что оканчивается сокращение благодаря работе фосфатаз, удаляющих с легких цепей миозина фосфатные группы.
- В. Аффинная хроматография на колонке с кальмодулином в качестве первой стадии очистки киназы легких цепей миозина вряд ли будет эффективной – в клетках очень много кальмодулина, обычно около 1% от общего белка клетки. В присутствии Ca^{2+} киназа будет связана с комплексом Ca^{2+} –кальмодулин, присутствующим в клеточном экстракте, и эффективного связывания с кальмодулином на колонке не получится. Поэтому две первые стадии в вашей процедуре очистки необходимы для того, чтобы отделить эндогенный кальмодулин и тем самым сделать возможным взаимодействие киназы с кальмодулином в колонке.

Литература: *Adelstein, R. S.; Klee, C. B. Smooth muscle myosin light-chain kinase. In Calcium and Cell Function (W. Y. Cheung, ed.), Vol. 1, pp. 167–182. New York: Academic Press, 1980.*

12-23

- А. Эффект ионов Ca^{2+} и диацилглицерола на функцию тромбоцитов указывает на то, что в их активации участвует фосфолипаза С. Коллагеновые волокна и тромбин активируют находящийся на поверхности тромбоцита рецептор, который в свою очередь активирует фосфолипазу С (предположительно, с помощью G-белка). Фосфолипаза С расщепляет фосфатидилинозитол-бисфосфат с образованием InsP_3 и диацилглицерола. InsP_3 вызывает мобилизацию запасов Ca^{2+} , в результате чего активируется киназа легких цепей миозина и происходит их фосфорилирование. Эту ветвь процесса можно стимулировать с помощью кальциевого ионофора A23187. Диацилглицерол активи-

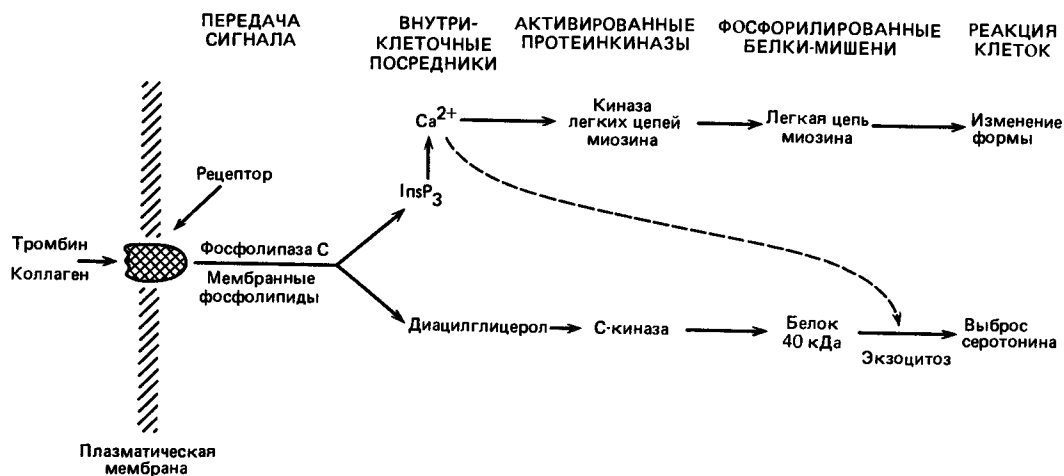


Рис. 12-22. Механизм активации тромбоцитов (ответ 12-23).

вирует С-киназу, фосфорилирующую белок с мол. массой 40 кДа; эту ветвь процесса можно стимулировать непосредственно диацилглицеролом. Для стимуляции выброса серотонина обе ветви процесса должны функционировать совместно. Общая схема активации тромбоцитов представлена на рис. 12-22.

Б. Для секреции серотонина необходимы и Ca^{2+} , и диацилглицерол, так как по отдельности они не вызывают секреции (рис. 12-10, Б). Эти эксперименты позволяют предположить, что в процессе участвует белок с мол. массой 40 кДа, хотя прямых доказательств этому нет и истинная роль данного полипептида неясна. Ионы Ca^{2+} , по-видимому, имеют более непосредственное отношение к секреции и способствуют каким-то образом слиянию мембран, необходимому для экзоцитоза.

Литература: Nishizuka, Y. Calcium, phospholipid turnover and transmembrane signaling. Phil. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.) 302, 101–112, 1983.

12-24

- А. Зависимость активации от наружного кальция и способность кальциевого ионофора активировать яйца указывают на то, что ключевой стадией в активации яйца является вход Ca^{2+} в клетку. Необходимость совместного действия инозитолфосфатов можно объяснить двумя путями: 1) оба инозитолфосфата вместе нужны для стимуляции ключевой стадии в механизме входа Ca^{2+} либо 2) процесс активации включает две стадии, каждая из которых контролируется своим инозитолфосфатом. Поскольку известно, что $(2,4,5)\text{InsP}_3$ способен вызывать мобилизацию запасов Ca^{2+} , следует отдать некоторое предпочтение второму варианту. Более конкретно, на первой стадии $(2,4,5)\text{InsP}_3$ может вызывать повышение внутриклеточного уровня Ca^{2+} за счет мобилизации внутренних запасов (его недостаточно для активации яйца). На второй стадии этот повышенный уровень Ca^{2+} в сочетании с $(1,3,4,5)\text{InsP}_4$ обеспечивает стимуляцию входа в клетку Ca^{2+} из внешней среды. Таким двухстадийным механизмом можно объяснить то, что одновременное введение в яйцо Ca^{2+} (в недостаточном для активации количестве) и $(1,3,4,5)\text{InsP}_4$ вызывает активацию яйца морского ежа.
- Б. Вероятно, $(1,4,5)\text{InsP}_3$ активирует яйца потому, что какая-то его часть превращается под действием инозитол-3-киназы в $(1,3,4,5)\text{InsP}_4$. Поэтому при инъекции в яйца $(1,4,5)\text{InsP}_3$ из него

образуется некоторое количество (1,3,4,5)InsP₄, что обеспечивает протекание двух (или одной) стадии процесса активации. Неэффективность в данном тесте (2,4,5)InsP₃ и (1,3,4)InsP₃ объясняется тем, что ни один из них под действием инозитол-3-киназы не может превратиться в (1,3,4,5)InsP₄, так что если они даже и способны мобилизовать внутриклеточные запасы Ca²⁺, то не могут вызвать вторую стадию активации.

Литература: Irvine, R. F.; Moor, R. M. Microinjection of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates sea urchin eggs by a mechanism dependent on external Ca²⁺. Biochem. J. 240, 917–920, 1986.

12-25

- А. Концентрация сАМР определяется равновесием между его синтезом, катализируемым аденилатциклазой, и расщеплением, осуществляемым фосфодиэстеразой сАМР. У *dunce*-мутантов, лишенных одной из форм фосфодиэстеразы сАМР, гидролиз сАМР идет медленнее, чем у обычных мух, и в результате уровень его повышен.
- Б. Можно было бы ожидать, что гомозиготные дупликации дадут удвоенную по сравнению с нормой активность, а при делециях активности не будет вовсе. Однако результаты экспериментов с дупликациями и делециями гена *dunce* в эту схему не укладываются, потому что у мух, как это следует из распределения активности в сахарозном градиенте (рис. 12-11), есть два различных гена фосфодиэстеразы сАМР. Поскольку у нормальных мух активности этих двух форм фосфодиэстеразы примерно равны, то удвоение одной из них дает увеличение общей активности в 1,5 раза, а исчезновение – уменьшение общей активности наполовину.
- В. Кофеин ингибирует фосфодиэстеразу сАМР, и поэтому можно ожидать повышения уровня сАМР у получавших его мух. Если за дефект обучаемости, ассоциированный с мутацией *dunce*, ответственно именно повышение уровня сАМР, то кофеин должен нарушать способность мух к обучению. Эксперименты показали, что так оно и происходит в действительности. Этот результат является сильным доводом в пользу той идеи, что дефект в обучаемости у *dunce*-мутантов обусловлен потерей активности фосфодиэстеразы, а не каким-нибудь, например, регуляторным нарушением, которое «выключает» фосфодиэстеразу и в то же время независимым образом влияет на процесс обучения.
- Г. Представленные здесь данные, безусловно, согласуются с заключением, что мутация *dunce* изменяет сам структурный ген фосфодиэстеразы сАМР. Тем не менее возможны и другие интерпретации, в частности ген *dunce* мог бы кодировать регулятор транскрипции, который абсолютно необходим для экспрессии структурного гена фосфодиэстеразы. Избыточная экспрессия такого фактора (при дупликации) могла бы вызвать усиление экспрессии гена фосфодиэстеразы, и, наоборот, отсутствие фактора в результате делеции сделало бы экспрессию структурного гена невозможной. Эта гипотеза «позитивного» регулятора транскрипции в принципе объясняет приведенные экспериментальные данные, однако в настоящее время ген *dunce* клонирован и секвенирован: его последовательность обнаруживает сильную гомологию с другими генами фосфодиэстераз, и, судя по всему, он и представляет собой структурный ген фосфодиэстеразы сАМР.

Было бы несправедливо не отметить, сколь значительную роль в этой истории сыграло простое везение. Генетикам, работавшим с мутацией *dunce*, было бы очень трудно выявить биохимическую природу продукта измененного гена (хотя определение последовательности и могло бы однозначно решить вопрос); точно так же биохимики, исследовавшие дефекты в системе циклических нуклеотидов, вряд ли смогли бы обнаружить нарушение, связанное с поведением. Все произошло гораздо быстрее, чем это обычно бывает, лишь потому, что две группы ученых работали в одном институте.

Литература: Byers, D.; Davis, R.L.; Kiger, J.A. Defect in cyclic AMP phosphodiesterase due to the *dunce* mutation of learning in *Drosophila melanogaster*. Nature 289, 79–81, 1981.

Chen, C.-N.; Denome, S.; Davis, R.L. Molecular analysis of cDNA clones and the corresponding genomic coding sequences of the *Drosophila dunce*⁺ gene, the structural gene for cyclic AMP phosphodiesterase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9313–9317, 1986.

Адаптация клеток-мишеней

12-26

- А. адаптация (десенситизация)
- Б. регуляция путем уменьшения числа рецепторов
- В. секвестрация рецепторов
- Г. хемотаксические рецепторы

12-27

- А. Правильно.
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. Гомологичная десенситизация — это потеря чувствительности к лигандам, которые связываются с одним и тем же рецептором.
- Г. Правильно.
- Д. Правильно.
- Е. Неправильно. Если уровень аттрактанта остается постоянным (независимо от его величины), бактерии быстро чередуют кувыркание и движение по прямой.
- Ж. Правильно.

12-28

- А. Различия в связывании CGP-12177 и дигидроальprenолола экстрактами обработанных изопротеренолом клеток позволяют предположить, что в лизате участки связывания на некоторых рецепторах недоступны для взаимодействия, из-за того что обращены внутрь везикул. Гидрофобный дигидроальprenолол проникает сквозь мембрану и связывается со всеми рецепторами, а CGP-12177, как гидрофильное соединение, напротив, не может проникать через мембраны и потому связывается только с рецепторами, контактирующими со средой. Из данных результатов следует, что в клеточных лизатах есть две популяции везикул: в одной рецепторы обращены наружу, в другой — внутрь. Эти две популяции разделяются при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы. Наличие активности 5'-нуклеотидазы только в одной из двух популяций указывает на то, что связывающая CGP-12177 популяция представлена везикулами, которые образовались из фрагментов плазматической мембраны.

Б. Корреляция кривых связывания CGP-12177 и зависящей от гормона активности аденилатциклазы позволяет предполагать, что между этими процессами существует связь, а именно рецепторы, связывающие CGP-12177,—это те же самые рецепторы, которые отвечают за активацию аденилатциклазы. В пользу такого вывода свидетельствует и то, что CGP-12177 связывается везикулами, образовавшимися из плазматической мембраны. Другая популяция везикул представлена, возможно, внутриклеточными везикулами, образовавшимися в процессе эндоцитоза, в которых участки связывания лиганда должны быть обращены во внутреннее пространство. Таким образом, из этих экспериментов можно сделать вывод: десенситизация, вызванная изопротеренолом, обусловлена интернализацией рецепторов, из-за которой они становятся недоступными для взаимодействия с гормоном и отделяются от белков, ответственных за сопряжение их с аденилатциклазой.

Литература: Hertel, C.; Muller, P.; Portenier, M.; Staehelin, M. Determination of the desensitization of β -adrenergic receptors by [^3H] CGP-12177. *Biochem. J.* 216, 669–674, 1983.

12-29

- А. Поскольку X-киназа фосфорилирует β -адренергический рецептор только тогда, когда с ним связан гормон, она и должна быть ответственной за гомологичную десенситизацию. Узкая специфичность к ассоциированной с гормоном форме рецептора ограничивает ее десенситизирующее действие именно такой формой (что по-существу соответствует рабочему определению гомологичной десенситизации). Специфичность этой киназы к β -адренергическим рецепторам, по-видимому, связана с изменением конформации при связывании гормона, что делает рецептор субстратом для киназы. Благодаря своей специфичности данная киназа получила название киназы β -адренорецептора.
- Б. Механизм, с помощью которого фосфорилирование β -адренорецептора приводит к его десенситизации, неизвестен. Существует, в принципе, несколько возможностей: 1) фосфорилирование рецептора вызывает в нем конформационное изменение, предотвращающее связывание лиганда, 2) фосфорилирование предотвращает взаимодействие рецептора с G-белком, 3) в результате фосфорилирования образуется участок связывания с другим белком, что опять-таки мешает взаимодействию с G-белком, 4) фосфорилирование может стимулировать погружение рецепторов внутрь клетки, при котором они оказываются отделенными как от гормона, так и от G-белка, 5) фосфорилирование может, наконец, инициировать поглощение рецепторов клеткой с последующей транспортировкой их в лизосомы и дегградацией.

В соответствии с предположением, высказанным в задаче 12-26, десенситизация β -адренергических рецепторов сопровождается поглощением их клеткой, что и может служить механизмом десенситизации. Однако в исследованиях, где проводилось встраивание очищенных компонентов в липидные везикулы, было обнаружено, что в результате фосфорилирования рецептора А-киназой нарушается его сопряжение с аденилатциклазной системой. Два этих механизма не являются взаимоисключающими, напротив, оба, вероятно, используются клеткой для обеспечения десенситизации.

Литература: Benovic, J. L.; Strasser, R. H.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. β -adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 2797–2801, 1986.

12-30

- А. Если фосфорилирование двух упомянутых субъединиц происходит независимо и с равными скоростями, то должны получаться четыре разные формы рецептора: нефосфорилированный, фосфорилированный по γ -субъединице, фосфорилированный по δ -субъединице и фосфорилированный по γ - и по δ -субъединице. При соотношении 0,8 моль P_i /моль рецептора будет фосфорилировано 40% и не фосфорилировано 60% субъединиц каждого типа. Таким образом, содержание разных форм рецептора составит: 36% без P_i ($0,6 \times 0,6$), 24% – с фосфатной группой только на γ -субъединице ($0,4 \times 0,6$), 24% – с фосфатной группой только на δ -субъединице ($0,4 \times 0,6$) и 16% – фосфорилированного по обоим субъединицам. При исходных условиях 1,2 моль P_i /моль рецептора соотношение форм будет следующим: 16% нефосфорилированных молекул, 24% – фосфорилированных по γ - и 24% фосфорилированных по δ -субъединице, 36% – фосфорилированных по обоим субъединицам.
- Б. На основании этих экспериментов можно заключить, что для развития десенситизации достаточно одной фосфатной группы на рецептор в составе либо γ -, либо δ -субъединицы. Для обоих препаратов размер фракции, сходной по характеру активности с необработанным рецептором, ближе всего к расчетному содержанию формы, не несущей фосфатной группы; 36 и 36% для условий 0,8 моль P_i /моль рецептора, 18 и 16% для условий 1,2 моль P_i /моль рецептора. Это означает, что фосфорилирование любой из двух субъединиц достаточно для «включения» десенситизации. Если бы для этого требовалось фосфорилирование какой-то определенной субъединицы, то в каждом препарате доля молекул рецептора, сходных по активности с необработанными, составляла бы 60% ($24 + 36$) для условий 0,8 моль P_i /моль рецептора и 40% ($24 + 16$) для условий 1,2 моль P_i /моль рецептора.

Литература: Huganir, R. L.; Delcour, A. H.; Greengard, P.; Hess, G. P. Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. Nature 321, 774–776, 1986.

12-31

Сопоставить набор интактных рецепторов бактерий с набором вызывающих ответ аттрактантов несложно: Tsr, например, отсутствует только у линии 2, и только эта линия не реагирует на серин. Следовательно, реакция на серин опосредуется рецептором Tsr. Точно так же выясняется, что Tar опосредует реакцию на аспартат, Trg – на рибозу, а Tap – на дипептиды.

Специфичность хемотаксических рецепторов закодирована в их названиях. Название Tsr образовано из первых букв слов *taxis for serine and certain repellents*; Tar соответствует *taxis for aspartate and certain repellents*; Trg – *taxis for ribose and galactose*. Сокращение Tap вначале обозначало *taxis-associated protein* и относилось к связанному с хемотаксисом белку, функция которого была неясна, но было показано, что его ген кластеризован с группой других хемотаксических генов; по удачному совпадению Tap можно расшифровать и как *taxis for peptides*.

Литература: *Manson, M.D.; Blank, V.; Brade, G.; Higgins, C.F.* Peptide chemotaxis in *E. coli* involves the Tap signal transducer and the dipeptide permease. *Nature* 321: 253-258, 1986.

12-32

- А. Оба клонированных рецептора, нормальный и укороченный, выполняют свою функцию — передачу сигнала — так же, как и рецепторы в бактериях дикого типа. При добавлении аспартата у бактерий всех трех типов изменения в направлении вращения тут же подавляются, значит, сигнал о присутствии во внешней среде аттрактанта (аспартата) передается на жгутики бактерий всех трех типов.
- Б. Адаптивные свойства бактерий, несущих клонированные рецепторы, резко отличаются от таковых у бактерий дикого типа. Если эти последние возвращаются к нормальной частоте кувырканий (изменений направления вращения) в течение 3 мин, то бактериям с клонированными нормальными рецепторами требуется на это около 50 мин, а бактерии с клонированными укороченными рецепторами не начинают кувыркаться и спустя 3 ч. Таким образом, бактерии с клонированными нормальными рецепторами адаптируются медленнее, чем бактерии дикого типа, тогда как бактерии с клонированными укороченными рецепторами, судя по всему, не адаптируются вовсе.
- В. Нарушение адаптации в случае бактерий с клонированными рецепторами указывают на изменения в скорости или степени метилирования рецептора. В основе неспособности бактерий с укороченным клонированным рецептором адаптироваться к высокой концентрации аспартата лежит неспособность укороченного рецептора метилироваться. Молекулярный механизм различий по способности к адаптации между нормальными бактериями и бактериями с клонированными нормальными рецепторами гораздо тоньше и имеет количественную природу. Заметим, что периоды адаптации у бактерий этих двух типов различаются примерно в 15 раз (3 мин и 50 мин) и точно так же различается число рецепторов на клетку у двух этих типов бактерий. (Клонированные гены, экспрессируемые из плазмид, часто экспрессируются на гораздо более высоком уровне по сравнению с их нормальными хромосомными гомологами). Таким образом, можно предположить, что метилазе требуется в 15 раз больше времени, чтобы метилировать большее количество молекул нормального рецептора.

Литература: *Russo, A.F.; Koshland, D.E.* Separation of signal transduction and adaptation functions of the aspartate receptor in bacterial sensing. *Science* 220, 1016-1020, 1983.

Фазы клеточного цикла и их причинная взаимосвязь

13-1

- А. митоз
- Б. цитокинез
- В. фаза М
- Г. интерфаза
- Д. фаза S
- Е. стряхивание митотических клеток
- Ж. М-стимулирующий фактор (M-phase-promoting factor, MPF)
- З. циклин

13-2

- А. Правильно. (Разумеется, необходимо, чтобы ДНК поровну распределилась между двумя дочерними клетками.)
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. В специализированных клетках различных органов можно измерить продолжительность клеточного цикла путем определения митотического индекса либо путем введения метки (^3H -тимидин) в целое животное с последующей фиксацией, изготовлением срезов и радиоавтографией исследуемой ткани.
- Г. Правильно.
- Д. Неправильно. Переходная точка в фазе G_1 , называемая точкой старта, — это момент цикла, после которого клетка не может не пройти оставшиеся фазы клеточного цикла. Состояние такой предопределенности предшествует вступлению в фазу S и синтезу ДНК.
- Е. Неправильно. Белков, у которых скорость синтеза изменяется на разных стадиях клеточного цикла, на удивление мало.
- Ж. Правильно.
- З. Неправильно. Цитоплазма из клеток в фазе G_2 не тормозит синтез ДНК в S-фазном ядре. Термин «блокада повторной репликации ДНК» означает отсутствие многократных циклов репликации в течение одного клеточного цикла. Блок повторной репликации ДНК служит причиной того, что S-фазные ядра не вызывают новых циклов синтеза в G_2 -фазных ядрах.
- И. Правильно.
- К. Правильно.
- Л. Неправильно. Синтез РНК не обязателен для вступления клетки в митоз, но синтез белка для этого необходим.
- М. Правильно.

13-3 Поскольку среди 25 000 клеток вы обнаружили 3 митоза, митотический индекс будет $3/25000 = 0,00012$. Если митоз длится 1 ч, а доля клеток в митозе равна 0,00012, то 1 ч составляет 0,00012 часть от общей продолжительности клеточного цикла. Следовательно, длительность клеточного цикла составит $1/0,00012 = 8300$ ч, что равно примерно одному году (8760 ч).

13-4

- А.** Общая продолжительность клеточного цикла равна времени, необходимому для удвоения числа клеток в популяции. Чтобы определить время удвоения, выберите на графике (рис. 13-1) любые две точки, между которыми число клеток изменяется в два раза. Соответствующий промежуток времени и есть длительность клеточного цикла. Например, можно взять такие две точки на рис. 13-1: 3×10^5 клеток (10 ч) и 6×10^5 клеток (30 ч). Популяция L-клеток мыши удвоилась за 20 ч (30 ч – 10 ч), следовательно продолжительность клеточного цикла составляет 20 ч.
- Б.** В общих чертах длительность фазы G_2 можно вычислить по данным, приведенным на рис. 13-2, А, фазы S – по данным, имеющимся на рис. 13-2, Б, а продолжительность фазы G_1 равна общей продолжительности клеточного цикла минус продолжительность фаз ($M + S + G_2$).

Включение ^3H -тимидина происходит только во время фазы S. Следовательно, митотические клетки не будут содержать метку, пока те из них, что находились в момент добавления метки в самом конце фазы S, не пройдут фазу G_2 клеточного цикла. Появление первых меченых митотических клеток через 3 ч после добавления ^3H -тимидина (рис. 13-2, А) свидетельствует о том, что фаза G_2 длится 3 ч. Однако большинство митотических клеток включают метку только через 4 ч после ее добавления (а некоторые становятся мечеными лишь через 5 ч). Эти различия свидетельствуют о том, что длительность фазы G_2 несколько варьирует: если бы длительность фазы G_2 была строго определенной, то с самого начала включения метки пометились бы сразу все 100% митозов. Таким образом, продолжительность G_2 у L-клеток мыши составляет от 3 до 4 ч.

Длительность фазы S можно установить по числу зерен серебра над мечеными митотическими клетками (рис. 13-2, Б). Клетки, находившиеся в момент добавления ^3H -тимидина в самом конце фазы S, включают его очень мало и, следовательно, над ними будет очень мало зерен серебра, тогда как клетки, находившиеся в начале фазы S, включают значительно больше метки, и поэтому над ними будет значительно больше зерен серебра. Важно то, что количество зерен серебра над клетками, находившимися в начале S-фазы и в фазе G_1 , одинаково, поскольку такие клетки включают метку в течение одного и того же промежутка времени (в течение фазы S). Таким образом, начало фазы S соответствует точке на графике (рис. 13-2, Б), где число зерен серебра на меченую клетку достигает уровня насыщения, т.е. эта фаза наступает примерно за 10 ч до митоза. Поскольку фаза G_2 продолжается около 3 ч, фаза S должна занимать примерно 7 ч.

Если длительность фазы M составляет 1 ч, фазы S – 7 ч и фазы G_2 – от 3 до 4 ч, то фаза G_1 должна продолжаться от 8 до 9 ч.

Литература: Stanners, C. P.; Till, J. E. DNA synthesis in individual L-strain mouse cells. Biochim. Biophys. Acta 37, 406–409, 1960.

13-5

- А. Во время второй тимидиновой блокады в популяции будут накапливаться клетки, находящиеся в начале фазы S, поскольку синтез ДНК невозможен. Таким образом, после отмыывания от тимидина во второй раз синхронизированная популяция будет находиться в фазе S.
- Б. Во время первой тимидиновой блокады тормозится цикл у всех клеток, находящихся в фазе S. В остальных клетках цикл проходит нормально до начала фазы, где он прекращается. Фазы G_2 , M и G_1 делятся в сумме 15 ч, поэтому присутствия тимидина в течение 18 ч будет достаточно, чтобы все клетки, изначально находившиеся не в фазе S, достигли ее начала. Таким образом, к концу первой тимидиновой блокады большинство клеток популяции будет в начале фазы S, а остальная часть популяции – в тех или иных точках фазы S. За 10 ч после снятия первой тимидиновой блокады вся популяция пройдет фазу S, но ни одна клетка не успеет вступить в нее снова. Когда наступает вторая тимидиновая блокада, ни одна клетка не находится в фазе S. За время этой блокады (16 ч) клетки смогут пройти клеточный цикл до начала фазы S и вся популяция будет находиться в этой части цикла.

На самом деле при тимидиновой блокаде синтез ДНК, по-видимому, не прекращается полностью, а скорее сильно замедляется. По этой причине при использовании двойной тимидиновой блокады все клетки популяции не находятся точно на границе фаз G_1 – S, а распределяются в пределах начального периода фазы S.

Литература: Xeros, N. Deoxyriboside control and synchronization of mitosis. *Nature* 194, 682–683, 1962.

Bootsma, D.; Budke, L.; Vos, O. Studies on synchronous division of tissue culture cells initiated by excess thymidine. *Exp. Cell. Res.* 33, 301–309, 1964.

Rao, P. H.; Johnson, R. T. Mammalian cell fusion: I. Studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* 225, 159–164, 1970.

Bostock, C. J.; Prescott, D. M.; Kirkpatrick, J. B. An evaluation of the double thymidine block for synchronizing mammalian cells at the G_1 -S border. *Exp. Cell Res.* 68, 163–168, 1971.

- 13-6 Одинаковая длительность фазы S в одном случае у гаплоида и диплоида, в другом случае у диплоида и тетраплоида – это не столь уж и удивительно. Если отдельные хромосомы и области внутри хромосом реплицируются в определенном порядке, то при уменьшении вдвое или удвоении числа хромосом порядок репликации не должен изменяться. Соотношение между числом генов, ответственных за механизм репликации (кодирующих ДНК-полимеразы, геликазы, факторы инициации и т. д.), и общим количеством ДНК также сохраняется. Напротив, у разных организмов соотношение между количеством этих генов и содержанием ДНК скорее всего варьирует, и этим может объясняться корреляция, на которую указывают данные в табл. 13-1.

Литература: Prescott, D. M. *Reproduction of Eucaryotic Cells*, pp. 85–86. New York: Academic Press, 1975.

13-7

- А. При каждом переносе происходит двадцатикратное разбавление (50 нл/1000 нл), поэтому после 10 переносов степень разбавления достигает 20^{10} или 10^{13} . Нет оснований предполагать, что при таком разбавлении биологическое действие соединения не уменьшается.
- Б. Появление активности MPF в отсутствие синтеза белка свиде-

тельствует о том, что активируется неактивный предшественник MPF. В принципе активация может быть связана с одной из посттрансляционных модификаций, например с расщеплением протеазой или с фосфорилированием. Предполагается, что MPF активируется за счет фосфорилирования.

- В. Чтобы поддерживать свое активированное состояние при последовательных переносах, MPF должен обладать способностью к самоактивации. Если бы, например, эта была протеаза, она могла бы активировать собственный неактивный предшественник путем расщепления, подобного расщеплению трипсиногена трипсином с образованием дополнительного количества трипсина. Однако в случае MPF более вероятно, что активный MPF действует как протеинкиназа, активируя свой неактивный предшественник путем фосфорилирования. При этом, по-видимому, совсем необязательно, чтобы MPF активировал сам себя; он мог бы, например, активировать другую протеинкиназу, которая в свою очередь активировала бы предшественник MPF. Тем не менее принцип был бы тот же самый.
- Г. Поскольку в незрелом ооците не обнаруживается активности MPF, последний не может вызывать исходного события активации. По всей вероятности, белок, синтезируемый в ответ на стимуляцию прогестероном (и, следовательно, чувствительный к действию циклогексимида), прямо или косвенно ответствен за начальную активацию MPF.

Литература: Wasserman, W.J.; Masui, Y. Effect of cycloheximide on a cytoplasmic factor initiating meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. Exp. Cell Res. 91, 381-388, 1975.

Дрожжи как модельная система

13-8

- А. почкующиеся дрожжи
- Б. делящиеся дрожжи
- В. рестриктивная; пермиссивная
- Г. *cdc* (cell-division cycle)
- Д. точка старта

13-9

- А. Неправильно. Ценность дрожжей как объекта для изучения клеточного цикла состоит главным образом в том, что с их помощью можно проводить углубленный генетический анализ проблемы. Они предоставляют уникальную возможность идентифицировать, клонировать и характеризовать гены, участвующие в регуляции клеточного цикла.
- Б. Правильно.
- В. Правильно.
- Г. Правильно.
- Д. Правильно.
- Е. Неправильно. Голодавшим клеткам дрожжей необходимо несколько часов, чтобы начать клеточный цикл после возобновления питания.

13-10

- А. Опыты со сменой температуры свидетельствуют о том, что мутант *cdc101* блокирован при 37°C в фазе G₁ клеточного цикла. Первый опыт показывает, что точка мутационного блока предшествует точке блокады гидроксимочевинной или совпадает

с ней, в ином случае клетки должны были бы делиться при понижении температуры до 20°C в присутствии гидроксимочевины. Второй опыт показывает, что блокада гидроксимочевинной относится к моменту цикла, наступающему после точки мутационного блока, поскольку клетки в отсутствие гидроксимочевины делятся один раз при повышении температуры до 37°C. Оба этих опыта вместе говорят о том, что мутационный блок *cdc101* относится к фазе G_1 клеточного цикла. Таким образом, в первом опыте при 37°C в культуре мутанта *cdc101* накапливаются клетки в фазе G_1 , а когда температуру понижают до 20°C и к среде добавляют гидроксимочевину, клетки продвигаются к фазе S, но останавливаются из-за блокады гидроксимочевинной и не делятся. Во втором опыте в присутствии гидроксимочевины при 20°C цикл блокируется на уровне фазы S, а когда гидроксимочевину отмывают и температуру повышают до 37°C, клетки нормально проходят через фазы G_2 и M до того, как блокируются в фазе G_1 . Следовательно, они совершают один цикл клеточного деления.

- Б. Результаты опыта с мутантом *cdc102* показывают, что клетки блокированы при 37°C в фазе S. Из первого опыта следует, что точка мутационного блока предшествует или совпадает с точкой блокады гидроксимочевинной, иначе клетки должны были бы делиться при температуре 20°C. Второй опыт говорит о том, что точка блокады гидроксимочевинной предшествует точке мутационного блока или совпадает с ней, иначе клетки могли бы делиться при 37°C. Вместе эти два опыта показывают, что точки мутационного блока и блокады гидроксимочевинной совпадают. Поскольку и гидроксимочевина, и мутация *cdc102* действуют на одну и ту же фазу клеточного цикла, порядок обработки не имеет значения; клетки останавливаются на фазе S и, следовательно, не делятся.

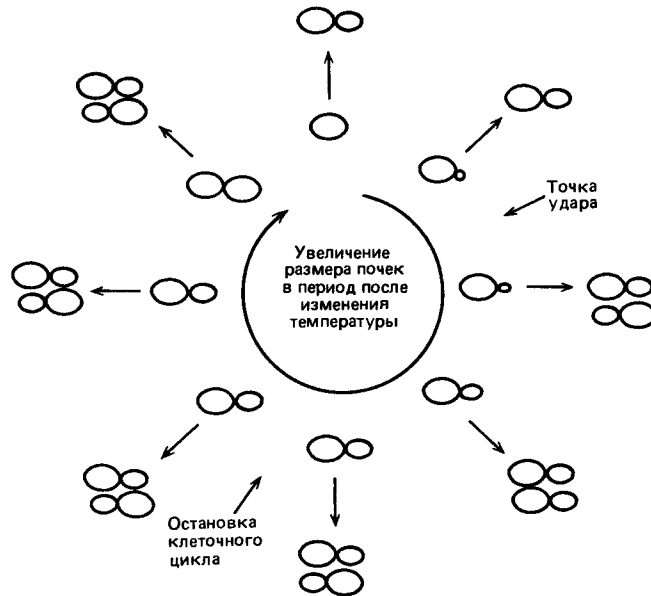
Литература: Hartwell, L. H. Cell division from a genetic perspective. J. Cell Biol. 77, 627–637, 1978.

13-11

- А. Точка удара для вашего температурочувствительного мутанта отмечена на рис. 13-15. После повышения температуры те клетки, которые находились в точке цикла, предшествующей точке удара, росли, достигая характерных размеров (landmark-морфология), но не делились. Клетки, находившиеся в момент повышения температуры в фазах цикла, следующих за точкой удара, делились и затем останавливались в ходе дальнейшего цикла, достигнув определенных размеров.
- Б. По характерной морфологии можно определить момент остановки цикла, как это видно на вашем объекте (рис. 13-15). Морфологические признаки, специфические для этого момента, резко отличаются от таковых в точке удара. Таким образом, у вашего мутанта точка удара и точка остановки роста не совпадают.

На первый взгляд может показаться странным, что точки удара и остановки роста не совпадают. Для пояснения можно провести следующую аналогию с установкой двигателя при сборке автомобиля. Двигатель должен быть смонтирован на шасси на ранней стадии сборки автомобиля. Если этого не сделать вовремя, то нельзя завершить сборку всего автомобиля, но можно тем не менее продолжать монтаж других его частей. Здесь момент, аналогичный точке удара и относящийся к монта-

Рис. 13-15. Точка удара, связанная с действием продукта гена, в котором произошла мутация (ответ 13-11). Точка удара указана стрелкой.



жу двигателя, наступит раньше, чем момент окончания сборки машины. При этом вид автомобиля без двигателя, который кажется полностью собранным, пока не заглянешь под капот, можно уподобить характерной морфологии клеток в точке остановки роста.

Литература: Hartwell, L. H. Cell division from a genetic perspective. J. Cell Biol. 77, 627-637, 1978.

Регуляция клеточного деления у многоклеточных организмов

13-12

- А. точка рестрикции (R)
- Б. факторы роста
- В. ростовой фактор из тромбоцитов (РФТ), или тромбоцитарный фактор роста (PDGF – platelet derived growth factor)
- Г. зависимость клеточного деления от прикрепления
- Д. состояние G_0 (или состояние покоя)
- Е. клеточное старение

13-13

- А. Правильно.
- Б. Правильно.
- В. Правильно.
- Г. Неправильно. Плазма не поддерживает рост фибробластов главным образом потому, что в ней отсутствует РФТ, который выделяется в сыворотку только при свертывании крови.
- Д. Правильно.
- Е. Правильно.
- Ж. Неправильно. У раковых клеток более низкая адгезивность, и они в меньшей степени, чем нормальные клетки, нуждаются в прикреплении для непрерывного роста.
- З. Правильно.
- И. Правильно.
- К. Правильно.

Таблица 13-6. Включение ^3H -тимидина клетками, растущими в необработанных чашках и в чашках, обработанных poly(HEMA) (ответ 13-14)

Тип чашки	Число клеток на чашку	Плотность расположения	Высота клетки, мкм	Включение ^3H -тимидина, имп/мин на 1000 клеток
Необработанная	60 000	Почти плотно	6	253
Необработанная	200 000	Плотно	15	55
Необработанная	500 000	Плотно	22	7
Poly(HEMA)	30 000	Редко	6	250
Poly(HEMA)	30 000	Редко	15	50
Poly(HEMA)	30 000	Редко	22	7

13-14 Результаты опытов свидетельствуют о том, что зависимое от плотности торможение пролиферации следует полностью отнести за счет изменений формы клеток. Эта зависимость становится очевидной, если при оценке включения ^3H -тимидина учесть разницу в числе клеток на чашку, выразив его, например, в имп/мин · 1000 клеток (табл. 13-6). Заметьте, однако, что на основании этих данных нельзя определить, «контролирует» ли пролиферацию именно форма клеток или оба эти параметра зависят от третьего фактора, каким-то образом связанного с субстратом. Такими возможными факторами могут быть исчезновение пучков микрофиламентов, уменьшение числа точек прикрепления к субстрату или уменьшение скорости поглощения питательных веществ.

Литература: Folkman, J.; Moscona, A. Role of cell shape in growth control. *Nature* 273, 345–349, 1978.

13-15 Из результатов в табл. 13-3 следует, что для 3ТЗ-клеток эти факторы роста необходимы в определенной последовательности. Если бы требовалось одновременное присутствие факторов роста, то ни один из вариантов обработки не приводил бы к вступлению в фазу S. Если бы факторы роста требовались независимо друг от друга (т.е. действовали бы при любом порядке добавления), то при всех вариантах предварительной обработки клетки вошли бы в фазу S. Судя по тому, что порядок добавления явно важен, клетки последовательно реагируют на факторы роста. Поскольку предварительная обработка в опыте 3 (РФТ, ФРЭ, а затем соматомедин С) наиболее успешно приводит к вхождению в фазу S, клетки, вероятно, отвечают на факторы роста именно в таком порядке.

Результаты более углубленных исследований позволяют предполагать, что РФТ вызывает состояние компетенции у покоящихся 3ТЗ-клеток, после чего они могут реагировать на ФРЭ и соматомедин С. Обработка компетентных 3ТЗ-клеток фактором ФРЭ приводит к тому, что они примерно 6 ч продвигаются к фазе S; действие на обработанные ФРЭ компетентные клетки соматомедином С приводит к вступлению их в фазу S в течение последующих 5 ч.

Литература: O'Keefe, E.J.; Pledger, W.J. A model of cell-cycle control: sequential events regulated by growth factors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 31, 167–186, 1983.

13-16

- А. Результаты первого опыта показывают, что в белке с мол. массой 170 кДа имеется участок связывания с высоким сродством к ФРЭ, и, следовательно, этот полипептид скорее всего и есть рецептор ФРЭ. Контрольный опыт по инкубированию препарата мембран в присутствии избытка немеченого ФРЭ показывает, что ФРЭ связывается с белком 170 кДа специфически, а не случайным образом.
- Б. Опыты 2, 3 и 4 показывают, что белок с мол. массой 170 кДа (рецептор ФРЭ) фосфорилируется радиоактивным фосфатом в присутствии γ - ^{32}P -АТР. Перенос фосфата из γ -положения в АТР свидетельствует, что рецептор ФРЭ является субстратом для протеинкиназы. Поскольку интенсивность мечения белка 170 кДа увеличивается в присутствии ФРЭ, стало быть и активность протеинкиназы стимулируется ФРЭ.
- В. Опыты 3 и 4 показывают, что рецептор ФРЭ может переносить фосфат от АТР на белок, следовательно, он является протеинкиназой. Опыт 3 менее убедителен, чем опыт 4. В опыте 3, хотя антитело и является специфичным к рецептору ФРЭ, все же нельзя исключить другие белки, в том числе и протеинкиназу, которые могли в виде примеси попасть в осадок. В опыте 4 рецептор ФРЭ вначале был отделен по мол. массе от других белков, которые могли бы присутствовать в осадке антитела. Опыт 4 мог бы привести вас к ложному заключению только в том маловероятном случае, если бы протеинкиназа тоже была белком 170 кДа.
- Г. Опыт 4 убедительно свидетельствует (с оговоркой, указанной в пункте В) о том, что рецептор ФРЭ служит субстратом для своей собственной протеинкиназной активности.

Литература: Cohen, S.; Ushiro, H.; Stoccheck, C.; Chinkers, M. A. A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 257, 1523–1531, 1982.

- 13-17 Опухоль, возникающая в результате 50 делений клетки, будет содержать 2^{50} клеток, т.е. $1,1 \times 10^{15}$ клеток. Если 10^8 клеток имеют массу 1 г, то масса всей опухоли будет $1,1 \times 10^7$ г. Таким образом, ограничение числа клеточных делений до 50 не слишком предохраняет от рака. Даже у 40-летнего человека, фибробласты которого в культуре делятся около 40 раз, опухоль после 40 клеточных делений может достигнуть массы более 8 кг.

Гены "социального контроля" клеточного деления

13-18

- А. метастазы
- Б. опухолеродные (онкогенные) вирусы
- В. трансформированные
- Г. ретровирусы
- Д. онкогены
- Е. ген *v-src*
- Ж. протоонкогены

13-19

- А. Правильно.
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. Для проявления трансформированного фенотипа

клеток, содержащих ген *v-src*, требуется постоянная экспрессия гена. Если температурочувствительный продукт гена *src* инактивируется в результате повышения температуры, то клетки очень скоро начинают вести себя как нетрансформированные. При понижении температуры клетки возвращаются к своему трансформированному состоянию по мере того, как накапливается достаточное количество активного белка – продукта гена *src*.

- Г. Правильно.
- Д. Правильно.
- Е. Неправильно. Кроме онкогенов, связанных с факторами роста, имеется несколько других видов онкогенов.
- Ж. Правильно.
- З. Неправильно. Продукт гена *src* прикрепляется к мембране посредством жирной кислоты, ковалентно связанной с его N-концом.
- И. Правильно.
- К. Правильно.
- Л. Правильно.

13-20

А. Отсутствие существенных различий по уровню фосфорилирования между известными мишенями p60^{src} не исключает того, что p60^{src} вызывает трансформацию за счет своей тирозинкиназной активности. Ключевой мишенью для трансформации может быть белок, присутствующий в клетке в очень малом числе копий. Стандартные методы анализа клеточных белков, такие, как двумерный электрофорез в геле, не позволяют обнаруживать такие редкие белки. Тем не менее эти экспериментальные данные четко указывают на то, что среди известных мишеней p60^{src} нет белка, ответственного за трансформацию.

Б. Связывание белка p60^{src} с мембраной может быть важным условием трансформации по крайней мере по двум следующим соображениям.

1. Возможно, мишенью для фосфорилирования служит редкий мембранный белок, который не фосфорилируется, если p60^{src} не находится в мембране. Эффективность взаимодействия между p60^{src} и предполагаемым мембранным белком-мишенью должна быть значительно выше для p60^{src} , связанного с мембраной, из-за разницы между двумерной диффузией в мембране и трехмерной диффузией в цитоплазме. 2. Другое возможное объяснение состоит в том, что трансформация непосредственно зависит от присутствия p60^{src} в мембране, а его тирозинкиназная активность не играет никакой роли. Например, p60^{src} мог бы вызвать трансформацию, взаимодействуя с G-белками или другими рецепторами в мембране.

Литература: Kamps, M.P.; Buss, J.E.; Sefton, B.M. Rous sarcoma virus transforming protein lacking myristic acid phosphorylates known polypeptide substrates without inducing transformation. Cell 45, 105–112, 1986.

13-21

А. Фибробласты и раковые клетки от одного и того же больного дают разные картины гибридизации, поскольку в раковых клетках часть гена утрачена. Потеря этого гена – очень редкое соматическое событие, оно случается менее чем в одной из миллиона клеток. Только в нейронах глаза его потеря приводит к неконтролируемому росту с образованием опухоли. Несомненно, ген *Rb* теряется и в такой же доле фибробластов, однако для них

не известно каких-либо биологических последствий этого события (очевидно, что оно не приводит к неконтролируемому росту).

- Б. Фибробласты от больного с односторонней ретинобластомой, по-видимому, идентичны нормальным клеткам, из чего следует, что этот ребенок унаследовал два нормальных гена *Rb*. Фибробласты от больного с двухсторонней ретинобластомой отличаются от нормальных. Интенсивность полос трех рестриктов из четырех вдвое меньше, чем в норме. На основании этого можно предположить, что один из генов *Rb* содержит делецию, захватывающую все три фрагмента. Заметьте, что три затрагиваемых фрагмента являются соседними на карте гена *Rb* (рис. 13-7).

Опухолевые клетки от обоих больных являются аномальными. У больного с односторонней ретинобластомой два фрагмента утрачены целиком, а третий присутствует в количестве, равном половине от нормы. Такой набор фрагментов указывает на то, что каждая копия гена *Rb* имеет делецию: одна делеция включает фрагменты 9,8 т. п. н. и 6,2 т. п. н., другая включает оба этих фрагмента и фрагмент 5,3 т. п. н. У больного с двухсторонней ретинобластомой полностью отсутствуют три фрагмента, а оставшийся имеется только в половинном от нормального количестве. Судя по этим данным, одна хорошая копия *Rb* здесь полностью захвачена делецией и остался только фрагмент 6,2 т. п. н. гена с исходно унаследованной делецией.

- В. Эти результаты точно соответствуют гипотезе о том, что ретинобластома вызвана утратой обеих копий гена *Rb*. Многие случаи ретинобластомы уже изучены и во всех обнаружена потеря или изменение гена *Rb*. Таким образом, можно считать вполне доказанным, что ретинобластома развивается в отсутствие функционального продукта гена *Rb*.
- Г. В настоящее время связь на молекулярном уровне между отсутствием продукта гена *Rb* и ретинобластомой не известна. Одно из очевидных объяснений состоит в том, что опухоль образуется в результате ошибки в развитии. В норме незрелые нервные клетки глаза пролиферируют до тех пор, пока не получают сигнал к остановке роста, после чего они дифференцируются, превращаясь в зрелые нервные клетки. Продукт гена *Rb*, возможно, участвует в этой сигнализации, поэтому в его отсутствие клетки не получают сигнала и, следовательно, продолжают расти, образуя опухоль.

Ретинобластома является одной из разновидностей рака, возникающих в результате потери функции гена. Другой хорошо изученный пример рака, развивающегося у детей в результате наследственной потери определенного гена, — рак почек Вильма.

Литература: Knudson, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 820–823, 1971.
 Fung, Y.-K. T.; Murphree, A. L.; T'Ang, A.; Qian, J.; Hinrichs, S. H.; Benedict, W. F. Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. Science 236, 1657–1661, 1987.

13-22

- А. Как уже обсуждалось в задаче 13-21, отсутствие плеча на любой из трех кривых свидетельствует о том, что во всех случаях необходимо только одно событие, чтобы началось образование опухоли у мышей на фоне экспрессии одного или обоих онкогенов.

- Б. Несмотря на то что при наличии двух онкогенов частота возникновения опухолей у мышей значительно выше, активация клеточного протоонкогена *ras* не может быть событием, необходимым для возникновения опухоли на фоне экспрессии MMTV-регулируемого онкогена *myc*. Активация клеточного протоонкогена *myc* также не может быть событием, необходимым для образования опухоли у мышей, на фоне экспрессии MMTV-регулируемого онкогена *ras*. Как указывалось в пункте А, если даже мыши содержат и *myc*, и *ras*, необходимо некоторое дополнительное присутствие *myc* и *ras* было достаточным условием для формирования опухоли, то у всех мышей развивались бы опухоли по мере полового созревания.
- В. Частота появления опухолей у мышей с двумя онкогенами будет значительно выше ожидаемой, если эффект действия отдельных онкогенов рассматривать как аддитивный. Следовательно, при совместном действии обоих онкогенов проявляется синергический эффект, судя по частоте образования опухолей. Однако, как отмечалось в пункте Б, активации даже обоих онкогенов недостаточно для возникновения опухоли. Таким образом, два онкогена, действуя вместе, открывают возможность для образования опухоли, а непосредственным стимулом служит одно из нескольких редких событий либо одно очень частое событие. Ни для одного из этих типов трансгенных мышей природа активирующих событий не ясна.

Литература: Sinn, E.; Muller, W.; Pattengale, P.; Tepler, I.; Wallace, R.; Leder, P. Coexpression of MMTV/v-Ha-ras and MMTV/c-myc genes in transgenic mice: synergistic action of oncogenes *in vivo*. Cell 49, 465–475, 1987.

Механика клеточного деления

13-23

- А. митотическое веретено
- Б. центросома
- В. профаза
- Г. кинетохоры
- Д. центромеры
- Е. прометафаза
- Ж. анафаза
- З. анафаза А; анафаза Б
- И. телофаза
- К. цитокинез
- Л. образование борозды
- М. сократимое кольцо
- Н. остаточное тельце
- О. клеточная пластинка
- П. фрагмопласт

13-24

- А. Правильно.
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. У прокариот не происходит сегрегации хромосом в митозе; во время деления их клеток дочерние хромосомы прикрепляются к особым участкам клеточной мембраны.
- Г. Правильно.

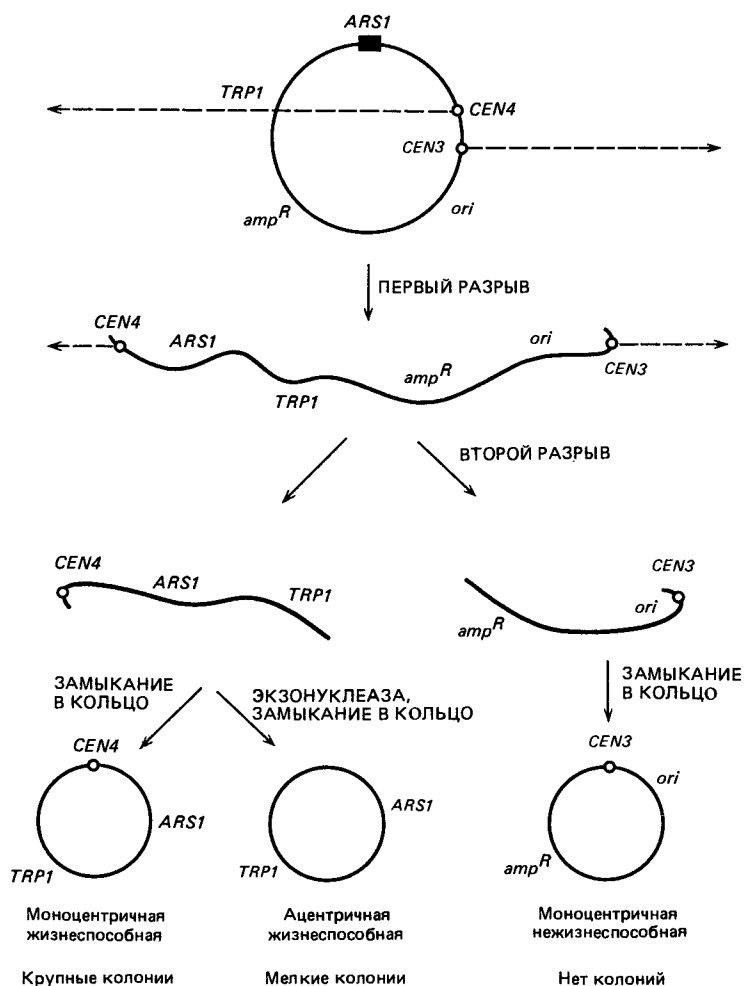
- Д. Неправильно. Большинство микротрубочек, сборка которых происходит на центросоме, менее стабильны, чем интерфазные микротрубочки.
- Е. Неправильно. У дрожжей и у высших эукариот последовательности ДНК в составе центромеры служат участками связывания белков. Ни в одном случае они не кодируют мРНК или белки.
- Ж. Правильно.
- З. Правильно.
- И. Правильно.
- К. Правильно.
- Л. Неправильно. Движения в анафазе Б обусловлены микротрубочками.
- М. Неправильно. Для образования ядра не требуется никакой особой последовательности ДНК.
- Н. Правильно.
- О. Правильно.
- П. Правильно.
- Р. Правильно.

13-25

- А. Дицентричные плазмиды устойчивы в бактериях, потому что механизм расхождения хромосом у них полностью отличается от того, который действует у дрожжей. Бактериальные хромосомы прикрепляются к специальным участкам клеточной мембраны, которые постепенно расходятся в результате образования мембраны между ними. Деление происходит между двумя участками прикрепления, и каждая дочерняя клетка получает одну хромосому. Таким образом, бактерии индифферентны к присутствию центромерных последовательностей плазмидной ДНК – очень удачно для исследователей, желающих клонировать центромерную ДНК.
- Б. Причины нестабильности дицентричных плазмид в дрожжах те же самые, что лежат в основе неустойчивости дицентричных хромосом у высших эукариот. Если две центромерные последовательности прикреплены к противоположным полюсам, то в результате действия силы, приложенной аппаратом веретена к молекуле ДНК, может разрушиться ее фосфодиэфирный скелет. Примерно в половине случаев плазида должна, по-видимому, сама ориентироваться на веретене так, чтобы две центромеры прикреплялись к противоположным полюсам. Следовательно, вероятность разрушения плазмиды при каждом клеточном делении очень высока, чем и объясняется нестабильность.
- В. Поскольку моноцентричные плазмиды очень стабильны, то механизм удаления центромерных последовательностей из дицентричных плазмид связан скорее всего с разрывом последних в процессе митоза. Как показано на рис. 13-16, в кольцевой плазмиде должны произойти два разрыва, чтобы центромеры могли разделиться при митозе. В результате таких разрывов центромеры, естественно, разделяются, оказываясь в линейных фрагментах исходной плазмиды. Если концы одного фрагмента соединяются с образованием кольца, то получившаяся плазида будет содержать одну центромерную последовательность (рис. 13-16). Однако размножаться в следующих поколениях смогут только фрагменты, содержащие точку начала репликации (*ARS1*) дрожжевого происхождения и селективный маркер (*TRP1*).

На основе такого механизма нелегко объяснить потерю обеих центромерных последовательностей; напротив, в соответствии

Рис. 13-16. Механизм возникновения моноцентричных и ацентричных плазмид из дицентричной плазмиды у дрожжей (ответ 13-25). Пунктирные стрелки указывают направление растягивания к полюсам веретена. Жизнеспособность означает возможность размножения плазмиды в дрожжах в селективных условиях (что требует наличия *ARS1* и *TRP1*).



с ним одна центромерная последовательность должна остаться: ведь как только дицентричная плазмида превратится в моноцентричную, она станет стабильной. Утрата обеих центромерных последовательностей, по-видимому, связана с иным, нежели простой разрыв, механизмом. Один из возможных путей (он следует в основном из общих сведений о дрожжах, которые мы здесь не приводим) заключается в том, что разорванные концы расщепляются экзонуклеазами. Эти ферменты иногда удаляют оставшуюся центромерную последовательность перед тем, как фрагмент замкнется в кольцо (рис. 13-16).

Литература: Mann, C.; Davis, R. W. Instability of dicentric plasmids in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 228–232, 1983.

13-26

- А. Отбор идет по продукту гена, а не по гену. После того как произошла утрата плазмиды (гена), клетка продолжает расти и делиться до тех пор, пока продукт гена не разавится до такого уровня, который уже не будет удовлетворять потребностям клетки в питании. Тогда в этой точке прекращается деление клетки. Скорее всего в связи с этим в каждый момент времени лишь от 5 до 25% клеток в культуре содержат плазмиду;

большинство клеток уже утратили плазмиду, но еще продолжают делиться.

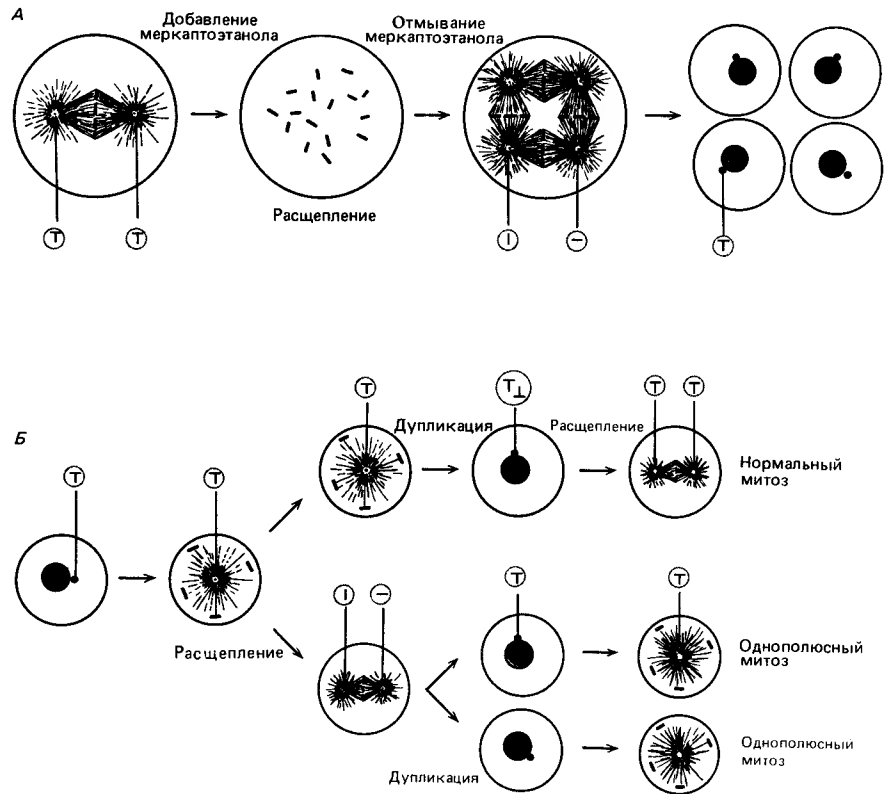
- Б. Анализ родословной ясно показывает, что плазмидная ДНК не распределяется поровну между материнской и дочерней клетками. При каждом делении, сопровождающемся потерей плазмиды, она утрачивается дочерней клеткой. Наблюдается, таким образом, некоторая несимметричность сегрегации, при которой плазида сохраняется преимущественно в материнской клетке.
- В. Даже если плазмиды реплицируются один раз за клеточный цикл, в материнских клетках будет накапливаться большое число плазмид из-за асимметричности их распределения. Если материнская клетка с одной плазмидой сохранит все реплицированные плазмиды в течение пяти делений, то она будет содержать 32 (2^5) плазмидные молекулы при соблюдении правила одной репликации за цикл.
- Г. Плазмиды с центромерами распределяются подобно хромосомам — одна копия остается в материнской клетке, а другая передается дочерней клетке. Поскольку все клетки имеют плазмиды, они (и их потомки) продолжают расти в селективных условиях; при этом колонии растут с максимальной скоростью. Плазмиды без центромер распределяются, как показывает анализ родословной, аномально. Поскольку только часть клеток дает потомство, которое может делиться в селективных условиях, колонии растут со скоростью меньше максимальной. В результате этого колонии клеток, содержащих плазмиды с центромерами, будут крупными, а колонии клеток с плазмидами без центромер — мелкими.

Литература: Murray, A.W.; Szostak, J.W. Pedigree analysis of plasmid segregation in yeast. *Cell* 34, 961–970, 1982.

- 13-27** Схема дубликации и расщепления центриолей, объясняющая нарушения клеточного деления, представлена на рис. 13-17. По-существу обработка меркаптоэтанолом приводит к тому, что centrosoma делится вторично, не влияя на дубликацию центриолей (рис. 13-17, А). (В первый раз centrosomas делятся, когда яйцо вступает в митоз.) В результате этого каждый из полюсов четырехполюсного веретена имеет только одну центриоль, а не две, как в норме. Очевидно, что centrosoma с одной центриолью точно соответствует полюсу веретена.

При делении яйца на четыре клетки каждая дочерняя клетка получает centrosoma с одной центриолью. Во время следующего цикла деления центриоль дублируется, образуя нормальную centrosoma с парой центриолей (рис. 13-17, А). Однако обычно в начале митоза centrosoma имеет две пары центриолей, а не одну. Таким образом, centrosoma дочерних клеток образует однополюсное веретено (рис. 13-17, Б). Как правило, это деление прерывается, и клетки входят в новый цикл деления, что дает возможность centrosome дублироваться во второй раз и образовывать две пары центриолей (рис. 13-17, Б, вверху). Эта вторая дубликация снова синхронизирует centrosomный цикл с циклом деления так, что дальнейшие деления проходят нормально (рис. 13-17, Б, вверху). В тех более редких случаях, когда дочерние клетки образуют двухполюсное веретено, centrosomas расщепляются, образуя две centrosomas, каждую с одной центриолью (рис. 13-17, Б, внизу). Хотя это расщепление позволяет клетке разделиться, дочерние клетки сталкиваются с той же проблемой, что и родительские, — наличием centrosomas с одной

Рис. 13-17. Дупликация и расщепление центросом в яйцах морского ежа, обработанных меркаптоэтанолом (ответ 13-27). **А.** Расщепление центросом с образованием полюсов веретена с одной центриолью под действием меркаптоэтанолом. **Б.** В результате прерывания клеточного деления и осуществления двух циклов дупликации центриолей образуется нормальная центросома (вверху). Расщепление центросомы с одной парой центриолей (внизу).



центриолю (рис. 13-17, Б, внизу). В этом случае центросомный цикл остается не синхронизированным с циклом деления.

Обратите внимание, что, хотя клеточные деления возвращаются к норме, яйца, претерпевшие деление на четыре клетки, развиваются аномально, поскольку ни одна из клеток не получает полного набора хромосом.

Литература: Maizia, D.; Harris, P. J.; Bibring, T. The multiplicity of mitotic centers and the time-course of their duplication and separation. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7, 1–20, 1960.

Sluder, G.; Rieder, C. L. Centriole number and the reproductive capacity of spindle poles. *J. Cell Biol.* 100, 887–896, 1985.

13-28

- А. Связанные микротрубочки стабильны за счет того, что оба их конца защищены от разборки: один – в результате прикрепления к центросоме, другой – к кинетохору. По-видимому, кинетохоры закрывают плюс-концы микротрубочек, изменяя таким образом равновесие реакции диссоциации субъединиц.
- Б. Микротрубочки распадаются, когда концентрация тубулина падает ниже критической величины. В этих условиях скорость сборки не равна скорости диссоциации, и микротрубочки постепенно укорачиваются. Наличие прикрепленных микротрубочек делает такое объяснение более вероятным по сравнению с двумя другими изложенными (в вопросе) возможностями. Ни откреплением от центросомы, ни случайным разрывом нельзя объяснить стабильность связанных микротрубочек.
- В. Возможный механизм исчезновения можно легко установить по временной последовательности событий. Чувствительными по-

казателями того, какой механизм действует, могут быть число и длина микротрубочек в промежуточный момент времени. Если микротрубочки отделяются, то число микротрубочек на центросому будет уменьшаться, однако длина их будет оставаться той же самой. Если микротрубочки деполимеризуются с конца, то их число будет оставаться постоянным, а длина будет одинаково сокращаться. Если микротрубочки разрушаются в произвольных отрезках, то их количество будет примерно одним и тем же, а распределение по длине очень широким.

Литература: Mitchison, T. J.; Kirschner, M. W. Properties of the kinetochore *in vitro*. II. Microtubule capture and ATP-dependent translocation. J. Cell. Biol. 101, 766–777, 1985.

13-29

- А. Если объем родительской клетки равен 1, то объем дочерней клетки будет равен 0,5. (Для расчета не нужно указывать единицы измерения. Поскольку мы вычисляем относительное увеличение площади поверхности, то размерности в итоге сократятся). Радиус родительской клетки может быть определен из формулы $V = 4/3\pi r^3$.

Полагая $V = 1$ и сделав преобразования, получим

$$r^3 = 3/(4\pi)$$

$$r = [3/(4\pi)]^{1/3}$$

$$r = 0,62.$$

Площадь поверхности родительской клетки составляет

$$A = 4\pi r^2.$$

Подставляя $r = 0,62$, получим

$$A = 4,81.$$

Такой же расчет для дочерней клетки, объем которой равен 0,5, дает значение $r = 0,49$. Тогда площадь поверхности одной дочерней клетки будет 3,02, а площадь поверхности двух дочерних клеток – 6,04. Относительное увеличение площади поверхности вычисляется путем деления:

$$\text{Увеличение} = (6,04 - 4,81)/4,81 = 26\%$$

Таким образом, при клеточном делении поверхность плазматической мембраны увеличивается на 26%. Такое увеличение, по-видимому, не должно создавать для клетки никаких проблем по двум причинам. Во-первых, большинство клеток при делении округляются. Для сферы характерно наименьшее отношение площади поверхности к объему среди всех трехмерных тел, следовательно, до округления площадь плазматической мембраны была больше вычисленной. Во-вторых, в большинстве клеток площадь внутренних мембран значительно превышает площадь плазматической мембраны, и они служат готовым материалом для образования новой плазматической мембраны.

- Б. Увеличение на 26% при каждом клеточном делении означает, что после деления общая площадь поверхности мембраны в 1,26 раза больше, чем до деления. Таким образом при 12 последовательных делениях, если общий объем яйца не увеличивается, площадь поверхности плазматических мембран возрастает в $(1,26)^{12} = 16$ раз. Это значительно более существенное увеличение, чем при одном клеточном делении; оно предполагает, что в яйце либо

имеется чрезвычайно большой внутренний запас мембран, либо одновременно с дроблением происходит синтез компонентов мембраны.

13-30

- А. Гипотеза хромосомной сигнализации предсказывает, что борозда на мембране будет образовываться только там, где выстроены хромосомы. Это предсказание согласуется с результатом первого деления, но не с характером второго деления, где образуются три борозды вместо ожидаемых двух.
- Б. Гипотеза полюсной релаксации предсказывает, что при первом делении должно быть две борозды, а не одна, как наблюдается. В тороидальном яйце веретена должны расслаблять кольцо клеточной поверхности с каждой стороны экваториальной плоскости. В соответствии с этим будут два участка клеточной поверхности, образующие борозды: в экваториальной плоскости и против нее с другой стороны тора. Как видим, события второго деления не совпадают с предсказаниями гипотезы полюсной релаксации.
- В. Гипотеза стимуляции, вызываемой звездами, предсказывает, что должны быть одна борозда в первом делении и три борозды во втором делении, и это согласуется с экспериментальными наблюдениями. В первом делении одна борозда ожидается потому, что нити веретена от двух полюсов взаимодействуют только в экваториальной плоскости. При втором делении нити веретена взаимодействуют не только в двух экваториальных положениях, но также и в положении третьей борозды.

Литература: *Rappaport, R.* Establishment of the mechanism of cytokinesis in animal cells. *Int. Rev. Cytol.* 105, 245–281, 1986.

Клеточная адгезия, соединения между клетками и внеклеточный матрикс

Межклеточные соединения

14-1

- А. эпителий
- Б. запирающие; прикрепительные; коммуникационные
- В. плотные
- Г. апикальная; базолатеральная
- Д. межклеточные адгезионные
- Е. адгезионный пояс
- Ж. кадгерины
- З. винкулин
- И. локальные (фокальные) контакты (адгезионные пластинки)
- К. десмосомы
- Л. полудесмосомы
- М. щелевой контакт
- Н. коннексоны

14-2

- А. Неправильно. Плотные контакты обеспечивают герметизацию зазоров между клетками.
- Б. Правильно.
- В. Неправильно. Эпителий кишечника в 10 000 раз более проницаем для ионов, чем эпителий мочевого пузыря.
- Г. Неправильно. Клетки скрепляются не только кальций-зависимыми, но и кальций-независимыми контактами. Плотные контакты, которые разрушаются при удалении кальция, играют второстепенную роль в скреплении клеток. Их основное назначение – герметизация зазоров между клетками в эпителии. Причина разъединения клеток в среде без кальция связана с тем, что от кальция зависит целостность адгезионных поясов.
- Д. Неправильно. Щелевые контакты являются проводящими контактами.
- Е. Правильно.
- Ж. Неправильно. Проницаемость щелевых контактов зависит от внутриклеточных концентраций Ca^{2+} и pH. Внеклеточные уровни кальция и pH строго регулируются физиологическими механизмами и обычно сильно не меняются.

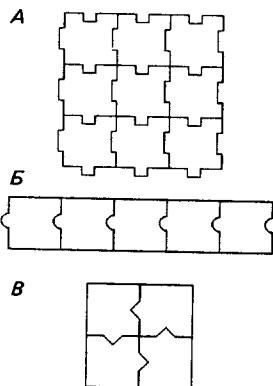


Рис. 14-19. Сборка белковых мономеров (ответ 14-3).

- 14-3 Три белковых мономера, представленные на рис. 14-19, различаются по способам сборки, что обусловлено размещением комплементарных связывающих доменов на их поверхности. Мономеры типа Б могут собираться в длинную цепь, какой и должна быть единичная герметизирующая цепочка плотного контакта. Моно-

меры типа А могут собираться в большие двумерные агрегаты, характерные для десмосом. Из мономеров типа В может образоваться только тетрамер, и, следовательно, они не способны (из-за отсутствия дополнительных доменов связывания) собираться в цепи или крупные агрегаты.

- 14-4** Ключевой результат ваших опытов (отмеченный руководителем) состоит в том, что флуоресцентная метка не распространяется по апикальным поверхностям всех клеток, а остается только в инфицированных клетках. Согласно липидной модели (рис. 14-2, А), наружные монослои контактирующих мембран соединены так, что они не прерываются, как на апикальных поверхностях соседних клеток. По этой же причине будут непрерывны и наружные монослои на всех базолатеральных поверхностях. Тот факт, что метка остается только в определенных клетках, не согласуется с предсказаниями, которые можно сделать на основе липидной модели.

Если верна белковая модель, то почему липиды в наружном монослое не диффундируют между апикальной и базолатеральной поверхностями отдельной клетки? Дело в том, что белковая модель не исключает полностью связи липидов только с апикальной поверхностью. В конце концов если белок герметично соединяет две клетки, то непроницаемый барьер должен захватывать и поверхность мембраны. Если барьер частично погружен в наружный монослой, что, по-видимому, и происходит, то он будет мешать диффузии липидов с одной стороны на другую. Действительно, в отсутствие Ca^{2+} липиды свободно диффундируют во всем наружном монослое, следовательно, при этом непрерывность герметизирующих цепочек в плотных контактах нарушается не только между соседними клетками, но и внутри мембран отдельных клеток.

Литература: Van Meer, G.; Simons, K. The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells, EMBO J. 5, 1455–1464, 1986.

- 14-5** Ваши результаты подтверждают модель двух состояний плотных контактов, поскольку показано, что сопротивление эпителия логарифмически зависит от числа герметизирующих цепочек в контакте: на это указывает прямая линия на графике (рис. 14-20). Линия, на которую ложатся полученные точки, может быть описана уравнением

$$R = R_{\text{мин}} P^{-n},$$

где

R – характеристическое сопротивление контакта,

$R_{\text{мин}}$ – минимальное сопротивление контакта (когда в нем нет герметизирующих цепочек),

P – вероятность того, что герметизирующая цепочка открыта,

n – число герметизирующих цепочек в контакте.

Величина P , по вашим данным, составляет около 0,4. Следовательно, вероятность того, что отдельная герметизирующая цепочка находится в открытом состоянии, относительно высока. Однако, если число герметизирующих цепочек достаточно велико, то вероятность того, что все они одновременно открыты, очень низка, так что в целом контакт практически непроницаем.

Структурная основа открытого и закрытого состояний неизвестна. Однако известно, что в плотном контакте есть три типа

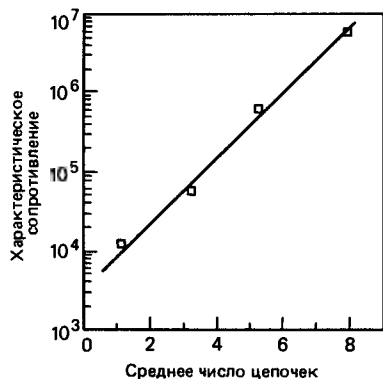


Рис. 14-20. График зависимости характеристического сопротивления от числа цепочек в плотном контакте (ответ 14-5).

белок-белковых взаимодействий: 1) контакты между отдельными субъединицами с образованием герметизирующей цепочки в одной клетке, 2) контакты между отдельными герметизирующими цепочками одной клетки с образованием характерной сети анастомозирующих цепочек и 3) контакты между герметизирующими цепочками соседних клеток, запечатывающих пространство между клетками. Если нарушить любой из этих контактов, то откроется проход для небольших молекул вдоль отдельной герметизирующей цепочки.

Литература: Claude, P. Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J. Memb. Biol.* 39, 212–232, 1978.

- 14-6** Возможное объяснение этих результатов состоит в том, что культивируемые клетки сердца мыши и клетки яичника крысы сообщаются друг с другом через щелевые контакты. Поскольку и норадреналин, и ФСГ действуют через один и тот же внутриклеточный посредник cAMP, молекула которого достаточно мала, чтобы проходить через щелевой контакт, то новые гормональные ответы в смешанных популяциях можно объяснить образованием щелевых контактов между совместно культивируемыми клетками. Например, добавление ФСГ приводит к повышению в клетках яичника уровня cAMP, который, проходя затем через щелевые контакты в клетки сердца, заставляет их сокращаться чаще.

Существует несколько экспериментальных подходов, позволяющих проверить наличие щелевых контактов между совместно культивируемыми клетками. Используя микроэлектроды, вы можете показать, что клетки яичника и клетки сердца электрически сопряжены, как это и должно быть при соединении клеток щелевыми контактами. Вы можете также обнаружить такую связь между клетками, вводя флуоресцентный краситель в одну клетку и наблюдая, проходит ли он в клетку другого типа. Наконец, вы можете проверить, участвуют ли щелевые контакты непосредственно в «общении», произведя микроинъекцию антител к щелевым контактам в одну из пар разнородных клеток и определяя, прекращают ли они сообщаться. (Можно также попытаться провести подобный эксперимент, добавляя антитела к щелевым контактам в среду во время смешивания клеток и наблюдая, нарушается ли при этом образование сообщающихся пар клеток.)

Литература: Lawrence, T. S.; Beers, W. H.; Gilula N. B. Transmission of hormonal stimulation by cell-to-cell communication. *Nature*, 272, 501–506, 1978.

14-7

- А. ПХ и флуоресцеин проходят в обе клетки на ранней 2-клеточной стадии (но не на поздней 2-клеточной стадии), благодаря тому, что клетки еще соединены протоплазматическими мостиками, по которым могут проходить крупные молекулы.
- Б. В компактизованном 8-клеточном зародыше флуоресцеин проходит во все клетки, поскольку они соединены щелевыми контактами. Через щелевые контакты могут пройти только молекулы с мол. массой $\lesssim 1000$, поэтому ПХ остается в той клетке, куда этот фермент был изначально введен. Различие в результатах для моментов до и после компактизации показывает, что образование щелевых контактов связано с компактизацией.
- В. Если вы подаете ток с электрода для инъекции ПХ, то он будет

регистрироваться на электроде для введения флуоресцеина только на ранней 2-клеточной и на компактизированной 8-клеточной стадии. Лишь на этих стадиях развития эмбриона соседние клетки электрически сопряжены. На 2-клеточной стадии сопряжение осуществляется за счет цитоплазматического мостика, оставшегося после деления клетки, а на 8-клеточной стадии – посредством щелевых контактов.

Литература: Lo, C.W.; Gilula, N.B. Gap junctional communication in the preimplantation mouse embryo. *Cell* 18, 399–409, 1979.

14-8

- А. Септированный контакт у беспозвоночных – аналог плотного контакта (просвечивающая электронная микроскопия).
- Б. Плотный контакт (метод замораживания–скальвания).
- В. Щелевой контакт (негативное контрастирование).
- Г. Щелевой контакт (метод замораживания–скальвания). На всех фотомикрографиях – ткани насекомых.

Внеклеточный матрикс

14-9

- А. внеклеточный матрикс
- Б. соединительная ткань
- В. гликозаминогликаны
- Г. гиалуроновая кислота
- Д. протеогликианы
- Е. коллагены
- Ж. эластин
- З. фибронектин
- И. базальная мембрана
- К. ламинин

14-10

- А. Неправильно. Внеклеточный матрикс играет активную роль, влияя на развитие, миграцию, пролиферацию, форму и метаболизм контактирующих с ним клеток.
- Б. Правильно.
- В. Правильно.
- Г. Правильно.
- Д. Правильно.
- Е. Неправильно. Внутриклеточный актин и внеклеточный фибронектин связаны косвенно, через рецептор фибронектина. Как актин присоединяется к рецептору фибронектина и почему при разрушении актина нарушается связь фибронектина с его рецептором, непонятно.
- Ж. Правильно.
- З. Неправильно. Упругость эластических волокон объясняется отсутствием у них вторичной структуры: эластин образует случайные клубки. Водородные связи, стабилизирующие альфа-спиральную структуру, слишком прочны, чтобы их могли разрушить те силы, которые деформируют молекулу эластина.
- И. Неправильно. Клетки связываются с молекулами внеклеточного матрикса непосредственно, с помощью специализированных молекул–рецепторов гликопротеинов на своей плазматической мембране. Примерами служат рецепторы фибронектина и ламинина. Кроме того, клетки связываются с внеклеточным матриксом опосредованно, через адгезионные белки.

14-11

- А. Циклогексимид – это ингибитор белкового синтеза. В отсутствие ОНФ-β-D-ксилозида он вызывает уменьшение включения $^{35}\text{SO}_4$, поскольку блокирует синтез сердцевинного белка, к которому присоединяются полисахаридные цепи субстрат для включения $^{35}\text{SO}_4$. В присутствии ОНФ-β-D-ксилозида включение $^{35}\text{SO}_4$ нечувствительно к циклогексимиду, следовательно, в этом случае включение не должно зависеть от синтеза белка. Сходство ОНФ-β-D-ксилозида с серин-ксилозой позволяет считать (справедливо), что ОНФ-β-D-ксилозид служит затравкой при формировании полисахаридных цепей. (Вспомните, что во всех случаях $^{35}\text{SO}_4$ находится в гликозаминогликанах.)
- Б. Большое количество материала, меченого $^{35}\text{SO}_4$, оказывается в среде в присутствии ОНФ-β-D-ксилозида потому, что этот материал не может включаться во внеклеточный матрикс ткани. Одна полисахаридная цепь, даже достигшая обычных размеров, чего в данном случае нет, слишком мала по сравнению с протеогликаном, к которому она присоединена в норме.
- В. ОНФ-β-D-ксилозид служит затравкой для присоединения сахаров, а ОНФ-α-D-ксилозид нет, что следует из его неспособности блокировать включение метки в ткань или стимулировать накопление метки в среде (табл. 14-2). По-видимому, трансфераза сахаров, ответственная за добавление очередного углеводного остатка в цепь, проявляет специфичность в отношении β-связи между ксилозой и соединенной с ней группой.
- Г. ОНФ-β-D-ксилозид может блокировать развитие слюнных желез в культуре ткани двумя путями. С одной стороны, в результате конкуренции с сахарами за присоединение к сердцевинному белку (обратите внимание на уменьшение количества метки в ткани, табл. 14-2) он может изменить содержание протеогликана во внеклеточном матриксе так, что клетки слюнных желез не смогут развиваться. С другой стороны, повышение концентрации свободных полисахаридных цепей может приводить к конкуренции за участки связывания протеогликана на поверхности клеток слюнной железы.

Литература: Thompson, H. A.; Spooner, B. S. Inhibition of branching morphogenesis and alteration of glycosaminoglycan biosynthesis in salivary glands treated with β-D-xyloside. *Dev. Biol.* 89; 417–424, 1982.

14-12

- А. Индивид, гетерозиготный по делеции гена α1(I)-цепи, имеет один нормальный ген и полностью лишен другого, поэтому молекулы коллагена типа I будут нормальными. Однако у таких индивидов вырабатывается только половина от обычного числа молекул коллагена.

Если цепь коллагена α1(I) с точковой мутацией может встроиться в молекулу коллагена, то нормальными будут только около 25% молекул коллагена. Вероятность включения нормальной цепи в каждую из двух позиций молекулы коллагена типа I составляет $(1/2)(1/2) = 1/4$.

Если цепь коллагена α1(I) с точковой мутацией не может встроиться в молекулу коллагена, то результат будет тот же самый, что и в случае делеции гена.

- Б. Гетерозиготный индивид с одной делецией гена α1(III)-цепи будет иметь абсолютно нормальный коллаген типа III, но в половинном от обычного количестве.

Если цепь коллагена α1(III) с точковой мутацией может

встроиться в молекулу коллагена, то нормальными будут только $(1/2)(1/2)(1/2) = 1/8$ молекул коллагена типа III.

- В. Расчеты в пунктах А и Б показывают, что потенциально точковые мутации значительно вреднее, чем делеции. Если при точковых мутациях вырабатываются продукты, которые включаются в молекулы коллагена, то гетерозиготная особь будет иметь исчезающе мало нормальных коллагеновых фибрилл. Напротив, индивид с одной делецией гена будет иметь 50% от обычного количества нормальных молекул коллагена, т.е. 50% обычного количества нормальных коллагеновых волокон. Таким образом, более вероятно, что точковые мутации, а не делеции являются доминантными и приводят к проявлению мутантного фенотипа.

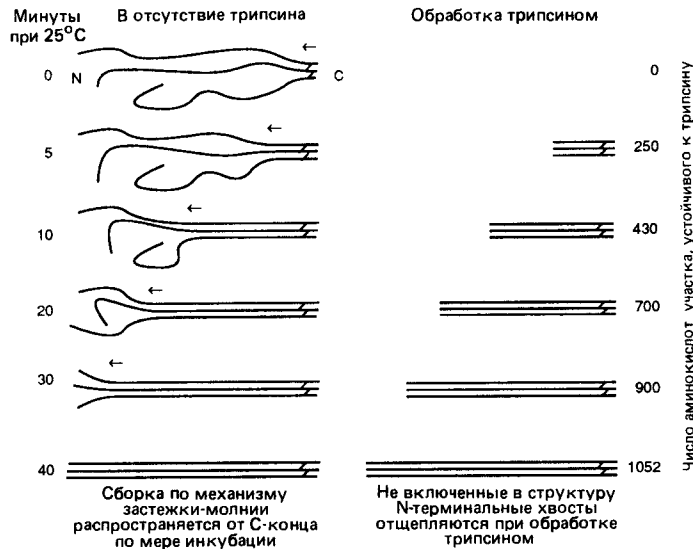
Литература: Sykes, B. The molecular genetics of collagen. Bioessays 3, 112–117, 1985.

14-13

- А. Трехкратное увеличение мол. массы, наблюдаемое в случае, когда оставались интактными дисульфидные связи, показывает, что устойчивые к трипсину пептиды в каждой частично восстановленной молекуле коллагена удерживаются вместе дисульфидными связями.
- Б. Поскольку рN-коллаген типа III и коллаген типа III дают одинаковые наборы фрагментов после обработки трипсином, их устойчивые пептиды почти наверняка идентичны. Следовательно, если все устойчивые к трипсину пептиды связаны дисульфидными мостиками, то искомые связи – это те, что находятся на С-конце, т.е. характерные для коллагена типа III.
- В. Если бы сборка при восстановлении начиналась в случайных местах, то набор фрагментов был бы более сложным. Главное же то, что некоторые из устойчивых пептидов не содержали бы участки для дисульфидной связи на С-конце. Из-за этого мол. масса таких не образующих дисульфидной связи пептидов не могла бы увеличиться. Однако все устойчивые пептиды содержат дисульфидную связь, поэтому сборка не должна начинаться в случайном месте. Таким образом, сборка начинается, вероятно, в специфическом участке, который располагается вблизи от дисульфидной связи на С-конце.
- Г. Постепенное возрастание размеров фрагментов с увеличением времени экспозиции означает, что сборка происходит по механизму застежки-молнии, начинаясь, как отмечено выше, в районе С-конца (рис. 14-21). При сборке по принципу «все или ничего» не должны были бы выявляться какие-либо промежуточные стадии процесса сборки.

Присутствие дискретных полос, различающихся по размеру на несколько сотен аминокислотных остатков, требует некоторых дополнительных объяснений. Если бы процесс по механизму застежки-молнии был абсолютно плавным, а все участки расщепления трипсином одинаково чувствительными, то можно было бы ожидать полной серии полос, каждая из которых отличалась бы от следующей на величину, отражающую пространственное расположение чувствительных к трипсину связей (остатков лизина и аргинина). Отсутствие такой серии полос свидетельствует о том, что либо 1) сайты расщепления неодинаково чувствительны (обработка трипсином в этих опытах кратковременная), либо 2) процесс происходит не плавно, а останавливается в некоторых характеристических точках, где сборка проходит труднее.

Рис. 14-21. Сборка по механизму застёжки-молнии молекул коллагена типа III, начинающаяся с С-конца (ответ 14-13). Результаты расщепления трипсином частично собранных молекул показаны справа. Устойчивые к действию трипсина пептиды — это те, что выявляются при электрофорезе.



Важно отдавать себе отчет в том, что эти данные по повторной сборке не имеют прямого отношения к процессу сборки коллагена типа III в естественных условиях. Ведь дисульфидные связи на С-конце представляют собой искусственные сайты нуклеации для повторной сборки, которых нет при естественном процессе. Тем не менее эти данные по восстановлению коллагенов согласуются с другими наблюдениями, сделанными в условиях *in vivo*. Например, при точковых мутациях сборка коллагена на С-конце проходит лучше, чем на N-конце. Это наблюдение говорит о том, что сборка начинается на С-конце и по механизму застёжки-молнии движется к N-концу. Такой способ сборки от одного конца имеет определенное теоретическое обоснование: в молекуле с многочисленными повторами, какой является коллаген, случайная инициация от внутреннего участка с очень малой вероятностью могла бы привести к правильному расположению полипептидов.

На основе всех этих соображений в настоящее время сложилось мнение, что сборка фибриллярных коллагенов происходит по механизму застёжки-молнии, начинаясь с С-конца, и что основной функцией С-терминального пропептида является упорядочивание расположения полипептидов для правильной сборки.

Литература: Bachinger, H. P.; Bruckner, P.; Timpl, R.; Prockop, D. J.; Engel, J. Folding mechanism of the triple helix in type III collagen and type III pN-collagen. *Eur. J. Biochem.* 106, 619–632, 1980.

14-14

- А. Прикрепление клеток к чашкам в двух вариантах опытов означает разные эффекты. В первом варианте прикрепление указывает на то, что пептид активен. Во втором варианте оно говорит о том, что пептид неактивен. В первом случае пептиды прикрепляются к чашке. Клетки же прикрепляются к пептидам и, следовательно, к чашке только в том случае, если пептиды содержат активный сегмент. Во втором случае клетки прикрепляются к фибронектину в чашке только при условии, что рецепторные участки на клеточной поверхности не заняты уже корот-

ким пептидом, т.е. присоединение пептида к клетке исключает возможность ее связывания с поверхностью чашки. Эти два типа экспериментов представляют собой альтернативные пути для выяснения одного и того же, а именно механизма специфического взаимодействия между рецептором, находящимся на клеточной поверхности, и лигандом, присутствующим в окружающей клетку среде.

- Б. В первом варианте опытов активность проявляют только те сегменты, которые содержат трипептид RGD (аргинин-глицин-аспарагиновая кислота). Данные для пептида 9 показывают, что даже очень малые изменения в этой короткой последовательности исключают возможность связывания: замена компактной молекулы глицина (G) на крупную молекулу валина (V) приводит к инактивации пептида.

Результаты второго варианта опытов согласуются с результатами первого варианта и доказывают, что последовательность RGD совершенно необходима для активности. Даже консервативные замены аргинина (R) на лизин (K) (одна основная аминокислота на другую) и аспарагиновой кислоты (D) на глутаминовую (E) (одна кислая аминокислота на другую) исключают связывание пептида с клеткой.

- В. Специфичность связывания малых пептидов открывает возможность использования аффинной хроматографии для выделения рецептора фибронектина, и эта стратегия была успешно применена. Сначала пептид, содержащий связывающую рецептор последовательность RGD, сорбировали на матриксе колонки, в данном случае на сефарозе. Затем через колонки пропускали растворенные детергентами белки плазматической мембраны, соблюдая условия, способствующие взаимодействию между рецептором и фибронектином. Далее колонку тщательно промывали для удаления несвязанных белков. Наконец, рецептор снимали с колонки, добавляя к отмывающему буферу пептид GRGDSP. При этом элюировался единственный белок с мол. массой 140 кДа. (Если использовали GRGESP, этого не происходило.)

Литература: *Pierschbacher, M.D.; Ruoslahti, E.* Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309, 30–33, 1984.

Pytela, R.; Pierschbacher, M.D.; Ruoslahti, E. Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell* 40, 191–198, 1985.

Ruoslahti, E.; Pierschbacher, M.D. Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell* 44, 517–518, 1986.

14-15

- А. При анализе гена коллагена $\alpha 1(I)$ исследуемого гена получают идентичные наборы фрагментов мРНК, следовательно, весьма вероятно, что исследуемый ген является геном коллагена $\alpha 1(I)$. Разумеется, хотелось бы убедиться в этом, показав, что тестируемый зонд гибридизуется непосредственно с зондом $\alpha 1(I)$.

Результат идентификации поврежденного гена несколько удивителен, поскольку коллаген типа I, компонентом которого является продукт данного гена, обнаруживается главным образом в коже, сухожилиях, костях, связках и внутренних органах. Основным коллагеном в кровеносных сосудах является коллаген типа III (см. МБК, табл. 14-3). По-видимому, коллаген типа I важен для поддержания целостности кровеносных сосудов, по крайней мере на ранней стадии развития.

- Б. Скрещивание между гетерозиготами приведет к простому менделевскому расщеплению. До проявления летального эффекта 25% зародышей будут гомозиготны по неповрежденному гену (набор 1), 25% – гомозиготны по поврежденному гену (набор 3) и 50% – гетерозиготны (набор 2). Поскольку набор 3 не проявляется у живых новорожденных, то одна треть из них будут гомозиготны по неповрежденному гену (набор 1), а две трети – гетерозиготны (набор 2).
- В. Клонирование неповрежденного гена, соответствующего гену с ретровирусной вставкой, – это прямой и очень плодотворный подход. Ниже приводится основная методика.
1. Приготовить библиотеку геномной ДНК мыши, несущей ретровирусную вставку. Использовать рестриктазу, разрезающую ДНК вне ретровирусных последовательностей.
 2. Используя в качестве зонда ДНК ретровируса, провести скрининг библиотеки для обнаружения клонов, содержащих ретровирусные последовательности.
 3. Субклонировать сегмент клеточной ДНК, фланкирующий (окаймляющий) ретровирусные последовательности. (Существенно, чтобы эта ДНК не содержала повторяющихся последовательностей.) Эта фланкирующая ДНК содержит интересный ген.
 4. Субклонированную клеточную ДНК использовать для скрининга библиотеки геномной ДНК (и/или библиотеки кДНК), полученной от нормальных мышей. Эти клоны содержат в неизмененном виде интересный ген.

Литература: Jaenisch, R.; Harbers, K.; Schnieke, A.; Lohler, J.; Chumakov, I.; Jahner, D.; Grotkopp, D.; Hoffmann, E. Germline integration of Moloney murine leukemia virus at the Mor 13 locus leads to recessive lethal mutation and early embryonic death. *Cell* 32, 209–216, 1983.

Schnieke, A.; Harbers, K.; Jaenisch, R. Embryonic lethal mutation in mice induced by retrovirus insertion into the $\alpha 1(I)$ collagen gene. *Nature* 304, 315–320, 1983.

Межклеточное узнавание и адгезия

14-16

- А. слизики, или миксомицеты
- Б. хемотаксис
- В. дискоидин-1
- Г. контактный сайт В; контактный сайт А
- Д. гомофильное; гетерофильное
- Е. N-CAM; L-CAM
- Ж. Е-кадгерин

14-17

- А. Неправильно. Утверждение, вероятно, правильно по духу, но оно ошибочно в деталях. Уоррен Льюис, который был пионером клеточной биологии, пытался привлечь внимание к важности адгезивных свойств клеток в тканях в то время, когда эту проблему полностью игнорировали современные ему биологи. Большую часть нашего тела составляет соединительная ткань, целостность которой зависит от качества матрикса, а не от заключенных в нем клеток (не так-то легко разъединить клетки ткани, что может подтвердить каждый, кто ел жесткий бифштекс).
- Б. Правильно.

В. Неправильно. В норме развитие тканей не связано с сортировкой смешанных случайным образом клеток разных типов.

Г. Правильно.

Д. Неправильно. Антитела к большинству компонентов клеточной поверхности не подавляют адгезию клеток. Насколько это известно, только антитела к гликопротеинам клеточной поверхности, участвующим в процессе адгезии, действительно ингибируют адгезию.

Е. Правильно. То, что плотно сцепленные клетки связаны более слабыми взаимодействиями, чем те, за счет которых образуется относительно недолговечный комплекс гормона с рецептором, несколько противоречит интуитивному представлению. Прочность межклеточного связывания основана на многочисленных слабых взаимодействиях, суммарный эффект которых очень силен.

Ж. Правильно.

З. Правильно.

14-18 Результаты, представленные на рис. 14-14, свидетельствуют в пользу химической сигнализации. На это указывают, в частности, ограниченная сфера действия сигнала (опыты А и Б), его способность обогнуть край стекла (опыт В) и проникать через полупроницаемую мембрану, но не через стекло (опыты А и В), выраженное влияние слабого потока жидкости (опыт Г). Эти опыты почти полностью убеждают в химической природе сигнализации, однако решающим доказательством должно быть выделение сигнального соединения.

Литература: Bonner, J. T.; Savage, L. J. Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold *Dictyostelium discoideum*. J. Exp. Zool. 106, 1–26, 1947.

14-19

А. Доля в популяции тех фагов, которые будут прикреплены по крайней мере одним хвостовым волокном в любой данный момент времени, равна единице минус доля фагов, не прикрепленных ни одним хвостовым волокном. Последняя равна $(0,5)^{12} = 0,00024$ для бактерий дикого типа и $(0,5)^6 = 0,016$ для *отрС⁻*-бактерий, т.е. в каждый момент времени 99,98% фагов популяции будет прикреплено к бактериям дикого типа и 98,4% – к *отрС⁻*-бактериям.

Б. Очень малая разница в относительных количествах фагов, прикрепленных к бактериям дикого типа и к *отрС⁻*-бактериям, на первый взгляд слабо согласуется с тысячекратной разницей в инфекционности. Однако поскольку фагу Т4 нужно передвигаться по поверхности бактерии, чтобы найти подходящее место для прикрепления своей базальной пластинки, то расчет для одного короткого момента времени приводит к ошибочным выводам. Например, если Т4 должен быть связан с поверхностью бактерии во время своего блуждания в течение 500 «моментов», то прикрепленными к бактериям дикого типа останутся $(0,9998)^{500} = 90\%$, а к *отрС⁻*-бактериям – только $(0,984)^{500} = 0,03\%$. Этого различия более чем достаточно для 1000-кратной разницы в инфекционности.

Благодаря связыванию с бактериальной поверхностью за счет многочисленных слабых взаимодействий фаг Т4 может перемещаться по клетке, не открепляясь от нее. Это позволяет ему искать относительно редкие на поверхности места, пригодные

для инъекции ДНК, — точки соединения между внутренней и наружной мембранами. По той же причине, вероятно, важны многочисленные слабые адгезионные взаимодействия между клетками: они позволяют клетке искать соседей, не прикрепляясь раньше времени.

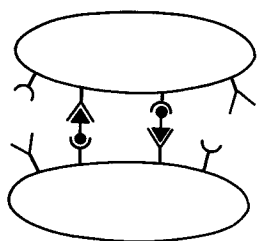
Литература: Goldberg, E. Recognition, attachment, injection. In Bacteriophage T4 (C. K. Mathews; E. M. Kutter; G. Mosig; P. B. Berget, eds.), pp. 32–39. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1983.

14-20

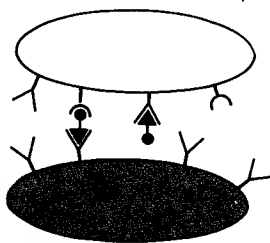
А. Проведенные наблюдения показывают, что в агрегации тромбоцитов участвуют два различных рецептора поверхности (адгезионные молекулы), которые связываются через молекулу фибриногена, служащую соединяющей молекулой-мостиком. Это механизм, показанный на рис. 14-17, Г. Клетки от больных с синдромом Гланцмана не могут агрегировать друг с другом, потому что у них отсутствует один из рецепторов фибриногена. Судя по тому, что два различных пептида, входящие в состав фибриногена, могут блокировать агрегацию тромбоцитов, молекулы фибриногена служат мостиками, связываясь с двумя разными рецепторами фибриногена. Кроме того, хотя каждый пептид может блокировать агрегацию, нарушая один тип связывания клетки с фибриногеном, ни один из них в отдельности не может подавлять связывание фибриногена более чем на 50%. Это опять-таки говорит в пользу того, что два пептида связываются с разными рецепторами.

Б. Клетки от больных с синдромом Гланцмана не агрегируют друг с другом, но способны образовывать контакт с нормальными клетками (рис. 14-22). Если в связывании клеток участвуют два разных рецептора, связывающиеся через фибриноген, то нормальные клетки и клетки от больных с синдромом Гланцмана будут способны образовать один из двух типов контактов, имеющих у нормальных клеток. Если в половину меньшего числа взаимодействий окажется достаточно, то клетки от больных с синдромом Гланцмана смогут агрегировать с нормальными клетками.

А. НОРМАЛЬНЫЕ x НОРМАЛЬНЫЕ



Б. НОРМАЛЬНЫЕ x С СИНДРОМОМ ГЛАНЦМАНА



В. С СИНДРОМОМ ГЛАНЦМАНА x С СИНДРОМОМ ГЛАНЦМАНА

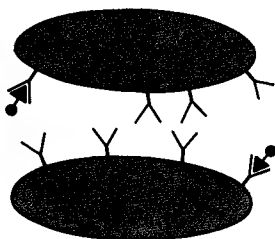


Рис. 14-22. Взаимодействие между нормальными тромбоцитами (А), между нормальными тромбоцитами и тромбоцитами больных с синдромом Гланцмана (Б) и между тромбоцитами больных с синдромом Гланцмана (В) (ответ 14-20).

14-21

Во взаимодействии между нервными и мышечными клетками участвуют, по-видимому, две разные адгезионные молекулы: чувствительный к нейраминидазе компонент на поверхности нервных клеток и чувствительный к проназе компонент на поверхности мышечных клеток. Остатки сиаловой кислоты в составе мембраны нервных клеток в действительности связываются компонентами базальной мембраны, окружающей мышечные клетки. При обработке мышцы проназой удаляются эти компоненты, а при обработке нейраминидазой нервных клеток удаляется сиаловая кислота. Мышечные компоненты могут насыщаться сиаловой кислотой и полимерами, содержащими сиаловую кислоту. Вопрос о том, используется ли вставочная молекула, прямо не ставился в связи с этими экспериментами. Тем не менее можно отметить, что для агрегации клеток не требуется добавления какого-либо компонента. Следовательно, если вставочная молекула необходима, она должна уже быть связана с одной или другой клеткой. Никаких данных против участия вставочной молекулы нет, однако считается, что нервные и мышечные клетки взаимодействуют между собой непосредственно (рис. 14-18, В).

Литература: *Bischoff, R.* Rapid adhesion of nerve cells to muscle fibers from adult rats is mediated by a sialic-acid-binding receptor. *J. Cell Biol.* 102, 2273–2280, 1986.

- 14-22** Различие в чувствительности клеток типов 5 и 21 к трипсину и 2-меркаптоэтанолу убеждает в том, что взаимодействие происходит между двумя разными молекулами клеточной адгезии. Диссоциация фактора из клеток типа 5 на два компонента при обработке 2-меркаптоэтанолом позволяет предположить, что один из этих компонентов — соединяющая молекула, связанная с клеткой типа 5 дисульфидным мостиком. С другой стороны, это может означать, что фактор из клеток типа 5 представляет собой двухкомпонентную молекулу клеточной адгезии.

Литература: *Crandall, M. A.; Brock, T. D.* Molecular basis of mating in the yeast *Hansenula wingei*. *Bact. Rev.* 32, 139–163, 1968.

Приложение

Константы

Обозначение	Константа	Значение
c	Скорость света	$3,0 \cdot 10^{17}$ нм/с
F	Константа Фарадея	23 ккал/(В·моль)
h	Постоянная Планка	$1,6 \cdot 10^{-37}$ (ккал·с)/фотон
N	Число Авогадро	$6,0 \cdot 10^{23}$ молекул/моль
R	Газовая постоянная	$2,0 \cdot 10^{-3}$ ккал/(К·моль)

Переменные

Обозначение	Размерность	Определение
ΔE_0	В	Стандартная электродвижущая сила ($T = 298$ К, все концентрации 1 М)
ΔE	В	Электродвижущая сила
E_0	В	Стандартный восстановительный потенциал
$\mathcal{E}$	ккал/фотон	Энергия фотона при определенной длине волны
ΔG^0	ккал/моль	Стандартное изменение свободной энергии ($T = 298$ К, при концентрации всех компонентов 1 М)
ΔG	ккал/моль	Изменение свободной энергии
K	(переменная)	Отношение молярных концентраций продуктов и реагентов при равновесии
λ	нм	Длина волны
M_r	Безразмерная величина	Относительная молекулярная масса (масса молекулы по отношению к 1/12 массы атома углерода)
n	Безразмерная величина	Число электронов, перенесенных в реакции восстановления
ν	с^{-1}	Частота
pH	Безразмерная величина	Отрицательный $\log_{10}$ молярной концентрации H^+
pK	Безразмерная величина	Значение pH, при котором половина групп диссоциированы
T	К	Абсолютная температура
V	В	Мембранный потенциал
Z	Безразмерная величина	Валентность (заряд) иона

Единицы

Обозначение	Название	Параметр	Способ пересчета
Å	Ангстрем	Длина	10^{-10} м; 0,1 нм
Бк (Bq)	Беккерель	Радиоактивность	1 расп./с; 60 расп./мин.
°C		Температура	K - 273
Ки (Ci)	Кюри	Радиоактивность	$3,7 \cdot 10^{10}$ Бк
см	Сантиметр	Длина	10^{-2} м, 10^7 нм
имп/мин	Импульсы в минуту	Радиоактивность	расп./мин · эффективность счета
Да	Дальтон	Молекулярная масса	$1,66 \cdot 10^{-24}$ г
расп./мин	Распады в минуту	Радиоактивность	(1/12 массы атома углерода) 0,016 Бк, (имп · мин ⁻¹)/эффективность счета ^a
г	Грамм	Масса	$6,0 \cdot 10^{23}$ Да
К	Кельвин	Температура	°C + 273
т.п.н.	Тысячи пар нуклеотидов	Нуклеотиды	1000 нуклеотидов или пар нуклеотидов
ккал	Килокалория	Энергия	4,18 килоджоулей
кДа	Килодальтон	Молекулярная масса	1000 Да
л	Литр	Объем	1000 мл
м	Метр	Длина	100 см, 10^9 нм
М	Моль	Концентрация	Число молей (растворенного вещества) на 1 л раствора
мкг	Микрограмм	Масса	10^{-6} г
мин	Минута	Время	60 с
мл	Миллиметр	Объем	1 см ³
моль	Моль	Число	$6,0 \cdot 10^{23}$ молекул
мВ (mV)	Милливольт	Разность потенциалов	10^{-3} В
нм	Нанометр	Длина	10^{-9} м, 10^6 Å
с	Секунда	Время	3600 с/ч; 86 400 с/сут
В (V)	Вольт	Разность потенциалов	1000 мВ

^a Эффективность счета для отдельных изотопов см. табл. радиоактивных изотопов.

Приставки

Обозначение		Название		Значение
Русское	Международное	Русское	Международное	
Э-	(E-)	Экса-	Exa-	10^{18}
П-	(P-)	Пета-	Peta-	10^{15}
Т-	(T-)	Тера-	Tera-	10^{12}
Г-	(G-)	Гига-	Giga-	10^9
М-	(M-)	Мега-	Mega-	10^6
к-	(k-)	Кило-	Kilo-	10^3
г-	(h-)	Гекто-	Hecto-	10^2
дк-	(dk-)	Дека-	Deca-	10^1
д-	(d-)	Деци-	Deci-	10^{-1}
с-	(c-)	Санتي-	Centi-	10^{-2}
м-	(m-)	Милли-	Milli-	10^{-3}
мк-	μ	Микро-	Mikro-	10^{-6}
н-	n	Нано-	Nano-	10^{-9}
п-	p	Пико-	Pico-	10^{-12}
ф-	f	Фемто-	Femto-	10^{-15}
а-	a	Атто-	Atto-	10^{-18}

Радиоактивные изотопы

Изотоп	Излучение	Период полураспада	Эффективность счета ^{a)}	Максимальная специфическая активность ^{b)}
^{14}C	бета	5 730 лет	96%	62 мКи/ммоль
^3H	бета	12,3 лет	65%	29 Ки/ммоль
^{35}S	бета	87,4 сут	97%	1490 Ки/ммоль
^{125}I	гамма, оже-электроны и преобразованные электроны	60,3 сут	78%	2400 Ки/ммоль
^{32}P	бета	14,3 сут	100%	9120 Ки/ммоль
^{131}I	бета и гамма	8,04 сут	100%	16 100 Ки/ммоль

^{a)} Максимальная эффективность для жидкостного сцинтилляционного счетчика при отсутствии тушения. В действительности у большинства образцов происходит некоторое тушение.

^{b)} Это значение соответствует одному атому радиоизотопа на молекулу. Если на молекулу приходится два атома радиоизотопа, то специфическая активность будет в два раза выше и т. д.

Генетический код

1-е положение (5'-конец) ↓	2-е положение				3-е положение (3'-конец) ↓
U	U	C	A	G	
U	F F L	S S S	Y Y *	C C *	U C A G
C	L L L	P P P	H H Q	R R R	U C A G
A	I I M	T T T	N N K	S S R	U C A G
G	V V V	A A A	D D E	G G G	U C A G

Аминокислоты Кодоны

A Аланин	GCU	GCC	GCA	GCG
C Цистеин	UGU	UGC		
D Аспарагиновая кислота	GAU	GAC		
E Глутаминовая кислота	GAA	GAG		
F Фенилаланин	UUU	UUC		
G Глицин	GGU	GGC	GGA	GGG
H Гистидин	CAU	CAC		
I Изолейцин	AUU	AUC	AUA	
K Лизин	AAA	AAG		
L Лейцин	CUU UUA	CUC UUG	CUA	CUG
M Метионин	AUG			
N Аспарагин	AAU	AAC		
P Пролин	CCU	CCC	CCA	CCG
Q Глутамин	CAA	CAG		
R Аргинин	CGU AGA	CGC AGG	CGA	CGG
S Серин	UCU AGU	UCC AGC	UCA	UCG
T Треонин	ACU	ACC	ACA	ACG
V Валин	GUU	GUC	GUA	GUG
W Триптофан	UGG			
Y Тирозин	UAU	UAC		
* СТОП	UAA	UAG	UGA	

Предметный указатель

- Автономно реплицирующиеся последовательности ДНК (ARS) 140–143
- Агенты, метилирующие ДНК 20, 21
- Адаптация клеток-мишеней 232–236
- Адгезия клеток 272–278
- Аденилатциклаза, активность связывания рецепторов 222, 232, 233
- Аденовирусы, промотор транскрипции 148, 149
- Аденозиндифосфат (ADP) 91
- ADP/АТР-транслоказа 76, 77
 - в митохондриях 77, 78
 - и поглощение O_2 81, 82
 - ADP-рибоза 222
- Аденозинтрифосфат (АТР)
- аналоги 199, 200, 212, 213
 - «блокированный» АТР 196, 197
 - в гликолизе 74–77
 - гидролиз *см.* Гидролиз АТР
 - и активный транспорт 60, 61
 - и биение ресничек 202
 - и клетки-меланофоры 212, 213
 - и потребление кислорода 83, 84
 - и сборка актина 200, 201
 - и сокращение терминальной сети 199, 200
 - и фотосинтез 85, 91
 - синтез в хлоропластах 91
 - АТР-синтетаза 77–84
 - стереохимия переноса фосфата 79, 80
 - ADP/АТР-транслоказа 60, 61
 - у *Paracoccus denitrificans* 99
- Адренергические рецепторы 226
- и десенситизация 233, 234
 - и эритроциты лягушки 223, 224
- Агрегация *см.* Клеточная адгезия
- Акрсомальная реакция, и мономеры актина 201, 202
- Аксон гигантского кальмара 61, 62
- Аксонемы 208
- жгутиков 208
 - и биение ресничек 204–206
 - сборка микротрубочек 208
- Аксоны *см.* Нервные клетки
- Актин 52, 214
- α -актинин, и мышечное сокращение 195
 - и гидролиз АТР 194, 199, 200, 201
 - и движение сперматозоидов 201, 202
 - и фагоциты 66
 - и цитохалазин В 200
 - микрофиламенты 195, 200, 264–266
 - полимеризация 193, 195, 199, 200
 - синтез у нематод 155, 156
- Актинин 195
- Актиновые филаменты, длина саркомеров 197
- и клеточный кортекс 198–202
 - и мышечное сокращение 197
 - и передача свободной химической энергии 197–198
- Актиномицин *см.* Антибиотики
- Алкилирование, механизм репарации 20, 21
- Аллолактоза 163
- Альбумин 124, 125
- Альпrenoлoл *см.* Ингибиторы
- Аминокислоты, амфипатическая спираль 108
- меченый метионин, и анализ ядерных ламинов 211
- Амплификация генов хорионических белков 144, 145
- с помощью полимеразной цепной реакции 184, 185
- Амфипатические молекулы 46
- Амфипатические спирали 108, 109
- Анализ родословных, и пренатальная диагностика 186
- и наследование плазмид у дрожжей 254, 255
- Анализ сдвига полос ДНК 160, 168, 169. *См. также* Метод торможения в геле
- Анилин 152, 153
- Анкирин 54
- Антибиотики 10
- актиномицин D 34, 181
 - альпrenoлoл 223
 - А23187 63, 58
 - ваиномицин 58
 - грамицидин 58
 - олигомицин 60, 61
 - цитохалазины 56, 200, 212
 - эдеин 15
- Антивирусные препараты 35
- Т-Антиген 144
- Антигистаминные вещества 216
- Антигела, и клеточная адгезия 273
- получение 216
 - против β -галактозидазы 103, 104
 - убикитин-специфические 102, 103
- Аполипопротеин В (арo-В) 184
- Аппарат Гольджи 117–121
- и клеточные компартменты 100, 101
 - стопки Гольджи 118, 126
 - транспорт в секреторных везикулах 118, 119, 124–126
- Апуринизация 16

- Арабиноза, метаболизм 161, 166, 167
 Арахидоновая кислота 226
 Арсенит, и цикл лимонной кислоты 72 74
 Аскорбат, и сигнал ЭПР 50, 51
 Астроциты, и их глиальные филаменты 209
 Атрактилат, и поглощение O_2 82
 Аутоиммунные заболевания, и антитела 216
 N-Ацетилглюкозамин 123
 N-Ацетилглюкозаминфосфат-трансфераза 123
 Ацелирование, и микротрубочки 207
 N-Ацетилнейраминавая (сиаловая) кислота 276, 277
 Ацетилхолин 225
 и K^+ -каналы 225, 226
 – рецептор 216, 234
 Ацикловир (ациклогуанозин) 35
- Базальная мембрана, и морфогенез 267
 Базальные тельца, и микротрубочки 202
 Бактериальные липополисахариды (ЛПС), и прикрепление T4 274, 275
 Бактерии *см. также* Список латинских названий организмов
 действие мутагенов 20 22
 кислое выщелачивание 91 93
 метанобразующие 82, 83
 механизм подвижности 83, 84
 УФ-репарация 16–19
 – хемотаксис 234–236
 Бактериородопсин 51, 52
 Бактериофаг лямбда (λ) 34, 186–188
 – T4 29, 30, 34 36
 – ϕ X174, 40, 34
 Бактериофаги 33–40
 – как векторы клонирования 186–188
 – кривая роста 34, 35
 – прикрепление к клеткам 274, 275
 – г-мутанты 35, 36
 Белки *см. также* Гормоны; Мембраны; Ферменты
 – амфипатические спирали 108, 109
 – ассоциированные с микротрубочками (MAP) 209
 – G-белки 118–121, 126, 223, 224
 – и адаптация 232 236
 – и внеклеточный матрикс 264–272
 – и внутриклеточная сортировка 100–126
 – и генетическая инженерия 40 45
 – и генетическая рекомбинация 28–33
 – и движение ресничек 202, 203
 – и клеточная адгезия 272 278
 – и клеточная подвижность 198–202
 – и клеточная сигнализация 215–236
 и клеточные контакты 259–264
 и клеточный цикл 237–241
 – и контроль клеточного деления 243–258
 – и контроль экспрессии генов 158 192
 – и мышечное сокращение 193–198
 – и окислительное фосфорилирование 77–84
 – и перенос через мембрану ЭР 112–117
 – и промежуточные филаменты 209 211
 и репарация ДНК 15–22
 – и репликация хромосом 140–146
 – и синтез ДНК 22 27, 140–146
 и синтез и процессинг РНК 146–157
 и транспорт веществ 57–64, 64–70, 104–126
 – и фотосинтез 84 93
 – и цитоскелет 211 214
 – мембранные 51 55
 – перенос в митохондрии и хлоропласты 107–109
 – принципы сборки 195–196
 – рецепторные *см.* Белки-рецепторы
 скорость деградации 102 104
 – хромосомные 127–157
 HMG 14 и 17 137
 – ntrB и ntrC 163–166
 – PF1, PF2 13–14
 Белки-рецепторы 218 220, 222–227
 адренергические рецепторы 223, 224, 226, 233, 234
 – глюкокортикоидные рецепторы 169, 170, 219–221
 – клеточной поверхности 222–227
 – мускариновые рецепторы 225
 – рецептор ацетилхолина 216, 234
 инсулина 59, 60
 – – трансферрина 66, 67
 – фактора *Виллебранда* 275–276
 – фибронектина 270, 271
 – ФРЭ 70, 246, 247
 – рецепторы ЛНП 67–70
 хемотаксические 234–236
 Белок – активатор катаболизма (CAP) 102–105, 133, 134
 – дестабилизирующий спираль 27
 – полосы 3 54
 – репрессор фага лямбда 171
 – родственный кальцитонину (CGRP) 179, 180
 – связывающий ретинол 124
 – связывающийся с одноцепочечной ДНК (SSB-белок) 28–30
 – Lex A, и SOS-ответ 8–10
 – NF- κ B 160, 161
 – ompC (белок C наружной мембраны) 274, 275
 Белые мышцы 194
 Бензойная кислота 72, 73
 Блоттинг *см. также* Гибридизация
 – Вестерн 103
 – Нозерн 184, 271
 – по *Саузерну* 129, 130, 139, 144, 177, 186–191, 250, 271
 Библиотека ДНК 44
 Болезни, герпес 35
 – дальтонизм 188–190
 – дефекты в генах коллагена 268
 – диабет 216, 217
 – гиперхолестеролемиа 67–70
 I-клеточная болезнь 123
 – наследственные 110, 123, 186, 250, 268
 – – пренатальная диагностика 186
 – несовершенный остеогенез 268
 – пищевое отравление 172
 – синдром *Вернера* 244
 – – *Гланцмана* 276
 – – *Гюнтера* 122
 Хёрлера 122
 – – *Элерса–Данлоса* 268
 – – *Целлевегера* 110, 111
 – сонная болезнь 110, 150, 151
 – рак молочной железы 251, 252
 – рак 247–252
 – ретинобластома 250, 251

- Бромдезоксигуанидинтрифосфат 145
 5-Бромурацилдезоксирибозид (БУДР) 95, 96, 145, 146
 Бутилмалонат, и ингибирование дыхания 82
- Ванадат 212, 213
 Валиномицин, влияние на подвижность 82, 83
 Везикулярный транспорт 123–126
 Вироиды 34
 Вирус везикулярного стоматита 118–121, 126
 герпеса 35
 FBJ остеосаркомы мышей 183
 - рака молочной железы мышей (MMTV) 220, 221, 251, 252
 табачной мозаики (ВТМ) 13
 Вирусы *см. также* Бактериофаги
 - герпесвирусы 35
 - имеющие оболочку 124
 - и репликация ДНК 23–27
 - и РНК 37, 38
 - капсид 33
 - кривая одностадийного роста 34
 - леса Семлики 124
 - метод классификации 34
 - механизмы репликации 34
 размножение 34, 35
 ретровирусы 37, 38, 271, 272
 - с негативным геномом 34
 - саркомы мышей *Молони* 219
 - саркомы *Рауса* 248–250
 - SV40 118 121
 Витамин С, и ЭПР 49, 50
 - и внеклеточный матрикс 266
 Внеклеточный матрикс 264–272
 - и коллаген 266
 - и полисахариды 264–266
 - и фибронектин 270
 Внутренняя мембрана хлоропластов 108
 Внутриклеточная сортировка 100–126
 - и аппарат *Гольджи* 117–125
 - и лизосомы 121 123
 - и митохондрии 107–109
 - и хлоропласты 107–109
 - и эндоплазматический ретикулум 111 117
 транспорт в секреторных везикулах 123–126
 Водород, и метанобразующие бактерии 82, 83
 Водоросли 88–90
 Вторичные половые признаки 219
 Выделение ДНК митохондрий и хлоропластов 97
 Выделение серотонина 229
- Галактоза, как маркер для процессинга олигосахаридов 118, 119
 β -Галактозидаза 102, 103
 Гаплоидные клетки 172–174, 198
 Гем, и синтез глобина 12
 Гемоглобин 12, 181, 182
 Ген глутаминсинтетазы 164–166
 - фосфоглицераткиназы 110
 - CAT 169, 219
 - *c-fos* 183, 184
 - *dnaB* 25, 26
 - *GAL1* 105, 106
 - *lacI* 19
 - VSG 150, 151
- Генная инженерия 40–45
 трансгенные животные 41
 Генетическая рекомбинация 28 33
 - и SSB-белок 28–30
 - начальная стадия спаривания 30
 - субстраты 29
 Хи-сайты 29
 Генетическая система митохондрий 94, 96
 Геном митохондрий 93–99
 хлоропластов 93–99
 ядерный 185–192
 Генный контроль, механизмы посттранскрипционной регуляции 178–185
 - начала транскрипции 162–178
 - организация и эволюция ядерного генома 185–192
 - стратегии 158–162
 Гены белков хориона 144, 145
 - β -глобина 132, 154
 - коллагена 268
 - и белок NF- κ B 160 161
 - и механизмы репликации хромосом 140 146
 - и механизмы дифференцировки 170–178
 - и пероксисомы 110
 - и промежуточные филаменты 210
 - и синтез РНК 146–157
 - контроль начала транскрипции 162–178
 - перекрывание 40
 - посттранскрипционный контроль 178–185
 - регуляторные белки 158–192
 - типа спаривания 172, 173
 - условно летальные мутации 27
 - УФ-индуцированные мутации 16–20
 - хромосомная ДНК и белки 127–136
 - человека и мыши, сравнительный анализ 132
 экспрессия и контроль 158–192
 - *dnaB* 25, 26
 - *sup* 204
 - *v-src* 248
 - *uvr* 17, 20
 - u2-мяРНК 186–188
 - *Drosophila* 219, 221
 - *Tetrahymena* 129
 Гепарин, и клеточная адгезия 277
 Гетеродуплексы, при транспозиции 39
 Гетерохроматин 136–137
 Гиалуроновая кислота, и клеточная адгезия 277
 Гибридизация 110
 - ДНК–РНК 151–152
 - ДНК митохондрий и хлоропластов 93–99
 - и гены ретинобластомы 250, 251
 - олигонуклеотидов 184, 185
 - полигенных хромосом 138
 - субтрактивная 161, 162
 Гибридные белки 115, 116
 Гидроксиметилглутарил-СоА-редуктаза 67 69
 Гидроксимочевина, и клеточный цикл 242
 Гидролиз АТР 25, 26, 122, 193, 194, 196, 197, 200, 201, 212
 - и гликолиз 74, 75
 - изменение свободной энергии 74
 - и липидный бислой 47
 - и расплетание ДНК 25, 26
 - и распределение пигмента 212
 - и сборка актиновых филаментов 200

- и транспорт веществ через мембрану 60, 61
- и циклический АМР 263
- стереохимия реакции 79, 80
- Гидрофобные аминокислоты 210
- Гидрофобные сегменты, пронизывающие мембрану 58, 115, 116
- Гипотеза везикулярного транспорта 118, 119
- неоднозначного соответствия при спаривании оснований 10
- образования цистерн при транспорте веществ в аппарате Гольджи 118, 119
- Гистамин 216
- Гистоны 140, 141
 - белки H4 и гены 16
 - и нуклеосомы 139, 140
 - и предшественник РНК 153, 154
- Глиальные филаменты 209
- Гликогенфосфорилаза 223
- Гликозаминогликаны, синтез 267
- Гликозилаза ДНК 16
- Гликолиз 75, 76
- Гликолипиды 46, 47, 55–57
- Гликопротеины, и клеточная адгезия 259
- структура 266
- Гликофорин 53, 54
- Глюкокортикоидные рецепторы 219–221
 - и С-терминальные делеции 169–170
- Гомодуплексы, и геномы Tn10-содержащих бактериофагов 39
- Гормоны *см. также* Сигнализация
- и межклеточная сигнализация 215 218
- инсулин 59, 60
- связывание с рецепторами 232, 233
- стероидные 219
- Горох 97
- Градиент потенциала 59
- Градиент рН 83, 84
- Грамицидин А 58
- График гидропатии 115 117
- Гуанозиндифосфат (GDP), и трансдукция 224
- Гуанозинмонофосфат (GMP) 233
- Гуанозинтрифосфат (GTP) 207, 208, 224
- Двунаправленная репликация 26, 27
- Дезоксирибонуклеиновая кислота *см. ДНК*
- Дексаметазон 219, 220
- Денатурирующие агенты 160
- Дендриты, и промежуточные филаменты 209
- Десенситизация, определение 233
- Десмосомы 260
- Детириозинирование, и созревание микротрубочек 207
- Детоксикация с участием ферментов семейства цитохрома P450 112
- Дефосфорилирование, и М-фаза 253
- Диацилглицерол, и десенситизация 232–234
 - и активация тромбоцитов 229, 230
- Дигидроальprenолол, и связывание с рецептором 232, 233
- Дидезоксисеквенирующий гель 45
- Динеин, и аксоны 204, 205
- Динитрофенол 82, 83
- Z-Диск, и мышечное сокращение 195
- Диоксид углерода 84–87
 - аналогии с образованием CH₄ 83
 - – и фотосинтез 85–87
 - – C₃- и C₄-растения 86, 87
- Диплоидные клетки 172–174
- Диплоидные ткани 138
- Диски полигенных хромосом 138
- Дисульфидные связи, и образование коллагена 268–270
- Дифференциальное окрашивание хромосом 137
- Дифференциальное центрифугирование 12, 14
- Дифференцировка клеток 170 178
- Дицентричная плазмида, структура 253, 254
- Длина саркомеров, и мышечное сокращение 197
- Длинные концевые повторы (LTR) 37, 38
- ДНК *см. также* Гены, Хромосомы
 - автономно реплицирующиеся последовательности (ARS) 142, 143
 - библиотеки кДНК 40, 41
 - вируса M13 25, 44, 45
 - – SV40 143, 144
 - – φX174 34
 - генетическая инженерия 40–45
 - гибриды ДНК–РНК 151–154
 - диски и междисковые участки 138
 - дифференциальное окрашивание 137
 - длинные концевые повторы (LTR) 37, 38
 - и SSB-белок 28–30
 - и 5-бромурацилдезоксирибозид (БУДР) 95, 96, 145, 146
 - и вирусы 33–38
 - и гидроксимочевина 242
 - и глюкокортикоидные рецепторы 169, 219, 221
 - и метод торможения в геле 121, 122, 213, 214
 - и синтез РНК 146–157
 - изгибание 133, 134
 - кластер генов хорионических белков
 - клонирование 40–45
 - метилирование 174–177
 - метилирующие агенты 20 22
 - механизмы репарации 15–23
 - механизмы репликации 22–28; 33–40
 - – – дочерная цепь 22, 23
 - – – и вирусы 33–38
 - – – и последовательности M13 25
 - – – и транспозон Tn10 39
 - – – полуконсервативный 22, 23
 - – – хромосом 140–146
 - – – электронная микроскопия 24, 26, 27
 - – – (3' → 5')-экзонуклеазная активность 23
 - мечение ³H 139, 140
 - миграция ветвей 30, 31
 - мутации *см. Мутации*
 - обратная транскриптаза 36, 37
 - олигонуклеотиды 153, 154
 - CG-островки 171
 - ошибочное спаривание оснований 22
 - полигенные хромосомы 138
 - ТАТА-последовательность 167, 168
 - расплетание 25, 26
 - расщепление микрококковой нуклеазой 134, 135, 139
 - рекомбинация 28–33
 - ренатурация 28, 39, 172
 - ретровирусная 37, 38
 - сайт связывания CAP 133, 134
 - CG-сайты 176 178

- агаС-связывающие сайты 166, 167
- содержание, и продолжительность S-фазы 238, 239
- а-специфические регуляторные последовательности 172, 173
- стероидное распознавание 219
- транспозиция 39, 40
- трансдукция 33, 34
- трансфекция 33, 34
- упаковка, и транскрипция 149, 150
- функции центромеры 253, 254
- хлоропластов 97
- хромосомная, и белки 127 136
- центромера (CEN3) 135
- центромерные последовательности 253, 254
- *Tetrahymena* 129 132
- кДНК 168, 169, 184
- библиотека 40, 41
- гибридизация 161, 162
- и ген β -глобина 132
- обработка 5-аза-С 161, 162
- ДНКаза I 134, 137, 139, 140
- ДНК-геликаза 25, 26
- ДНК-лигаза 42, 43
- ДНК-полимераза 24, 25
- (3' $\rightarrow$ 5')-экзонуклеазная активность 23
- ДНК-топоизомераза 23, 27
- Дрожжи, и хромосомы 253
- мутанты *pet494* 98
- почкование 93
- рост и деление 241 243
- регуляция типа спаривания 172 174
- создание плазмид 253, 254
- спаривание у *Hansenula winei* 277, 278
- центромера (CEN3) 135, 136
- эксперименты по росту 105, 106
- Ty1-элемент 190, 191
- ARS-элементы 142, 143
- Дыхание 72–74
- Дыхательная цепь 77 84, 99
- Жгутики, и микротрубочки** 202, 203
- механизмы движения 232
- мутация *pf14* 204–206
- синтез белка 14
- у *Chlamydomonas* 203–206
- фазовая вариация у *Salmonella* 172
- Железо, транспорт в крови** 64
- Железы, и процессы клеточной сигнализации** 215–221
- и стероидные гормоны 219
- Жирные кислоты, окисление** 72
- Зародыш мыши, и межклеточные контакты** 264
- ретровирусный мутагенез 271, 272
- Зеленые водоросли, и фотосинтез** 88–90
- Змеиный яд** 47–49
- Зрение, генетика дальтонизма** 188–190
- Изменение свободной энергии (ΔG)** 92
- Изопротеренол, и связывание 3H -дигидроальprenолола** 232, 233
- Иммуноглобулины, экспрессия** 160
- Иммунофлуоресцентная микроскопия** 120
- Ингибиторы см. также Антибиотики; Яды**
- альprenолол 223
- 5-азацитидин (5-аза-С) 161, 162
- ванадат 213
- гидроксимочевина 242
- коклюшный токсин 226
- колхицин 212
- малонат 92
- 3'-О-метил-GTP 148
- ММНГ 20
- о-нитрофенил- α - β -D-ксилозид 267
- олигомицин 82, 83
- протеаз 228
- хлорамфеникол 20
- холерный токсин 228
- цианид 80, 82
- циклогексимид 15, 107, 114, 145, 160, 221, 240, 267
- цитохалазин В 56, 200, 212
- эдеин 15
- яд паука 63
- ATP- γ -S 200, 201
- CGP-12177 232, 233
- DCCD 83
- DCMU 89–91
- FCCP 83, 89–91
- GrpNr 224
- Инозинтрифосфат** 199, 200
- Инозитолфосфат, активация яиц морского ежа** 230
- и синтез простагландина E₂ 226
- Инсулин** 216, 217
- Интроны и экзоны** 154, 155
- Ионофоры**
- валиномицин (K⁺) 83, 84
- 2,4-динитрофенол (H⁺) 81, 83
- A23187 (Ca²⁺) 58, 63
- FCCP H⁺ 83, 84
- Инфекционные процессы, бактериальные и вирусные** 35
- и геномы ретровирусов 37, 38
- Калиевые каналы** 225
- Кальмодулин** 228, 229
- Кальция ионы** 57–59, 63
- внутриклеточный переносчик 226 –232
- и активация яиц 230
- и десенситизация 233
- и сокращение мышц 196, 197
- и терминальная сеть 199, 200
- и A23187 63
- Кальций-зависимые контакты** 259
- Кальцитонин, и альтернативный сплайсинг** 179, 180
- S1-Картирование** 155, 156
- Кейлин Дэвид** 80
- А-Киназа** 227, 228, 233, 234
- Кинезин** 207
- Кинетохоры, и сборка микротрубочек** 208
- связь с веретеном 252, 253, 256
- Кислород, и цикл лимонной кислоты** 72 74
- и синтез ATP 81, 82
- и эволюция митохондрий 93
- и *Thiobacillus ferrooxidans* 91 93
- образование в фотосистеме II 88–90
- поглощение митохондриями 82

- Клетки, в фазе G₁ 237, 243
- волос, и промежуточные филаменты 209
 - выживаемость при УФ-облучении 16–17
 - дикого типа 118, 119
 - и метилирование 5S-РНК 174, 175
 - и мутации 271, 272
 - мышечные 276
 - печени, активность орнитиндекарбоксилазы 104
 - - митохондрии 72
 - - синтез липопротеинов низкой плотности 184
 - - структура хроматина 134
 - - экзо- и эндоцитоз 66
 - сердца, K⁺-каналы 225
 - - контроль частоты сокращений 263, 264
 - - митохондрии 71, 72
 - щитовидной железы 179, 180
- Клеточная линия А-431 246, 247
- Клеточная сигнализация 215–236. *См. также* Сигнализация
- Клеточная мембрана *см.* Мембраны
- Клеточное ядро *см.* Ядро
- Клеточное деление 237–258
- Клеточный кортекс 198–202
- Клеточный цикл 237–241
- Клеточные контакты (соединения) 259–264
- Клонирование, библиотеки кДНК 41
- векторы 41–45
 - геномной ДНК 41–44
 - и ген ретинобластомы 251
 - и промежуточные филаменты 209–211
 - кДНК клеток печени 184
- Кноп Франц* 72
- Кодон-антикодон, взаимодействие 13, 14, 25
- Кодоны, и генетический код 9
- и синтез белка 9, 10
 - ошибочное встраивание 14, 15
 - стартовые 10
 - терминации 13, 40
- Кожа, и внеклеточный матрикс 265
- Коллаген 265, 270
- типа III 268
 - типа IV 266
 - рN 268
- Колхицин 207, 214
- Компактизация 8-клеточного зародыша 264, 273
- С-конец белка 11, 102, 103, 114, 115
- Н-конец белка 102–104, 114, 115
- Конститутивная секреция 100
- Котрансляционное встраивание 114, 115
- Кортекс 198–202
- Кортизол 219
- Кости 265, 268
- Кребс Ханс* 72
- Кровеносные сосуды, репарация 275, 276
- Ксилозиды, роль в морфогенезе 266, 267
- Кувярканье клеток, и хемотаксические рецепторы 232
- β-Лактамаза 11
- Лактоза, и аллолактоза 163
- Ламеллоподии, и движение 211, 212
- Ламины, и промежуточные филаменты 210, 211
- Лизат ретикулоцитов 11, 181, 182
- Лизогенные бактериофаги 35, 36
- Лизосомы 64, 66
- и транспорт из аппарата *Гольджи* 121, 123
- Лизодим 35
- Липидный бислой мембран 46–51, 115–117
- Липиды 46–51
- и плотные контакты 260, 261
 - мечение нитроксильным радикалом 49–51
 - ток 55
- Липополисахариды (ЛПС), и прикрепление фага 274, 275
- Липопротеины 64, 66–70, 184
- Липосомы, и плотные контакты 261
- Лягушка, β-адренергические рецепторы 223
- и деление клеток 239–241
 - развитие яйца 145, 146
- Лямбда-интеграза 29
- Макроэргические фосфатные связи 75, 76
- Малонат, и цикл лимонной кислоты 72–74
- и поглощение O₂ 82
- Маннозо-6-фосфат как маркер узнавания 122, 123
- Маркеры, для процессинга олигосахаридов 118–121
- Междисковые участки, и хромосомы 138
- Меланофорные клетки 212, 213
- Мембраны, ассоциированные белки 51–55
- и кривая связывания токсина 63
 - и перенос белков 86, 87
 - и холестерол 67–70
 - калиевый канал 225
 - липидный бислой 46–51
 - пероксисом 83, 84
 - плазматическая мембрана 46–70
 - потоки ионов 57–64
 - распределение G-белков 92, 93
 - схема поперечного сечения 53
 - транспорт молекул 57–70
 - углеводы 55–57
 - хлоропластов 82
 - эндоплазматического ретикулума 111–117
- Меркаптоэтанол, и клеточная адгезия 277, 278
- и эффекты клеточного деления 255, 256
- Метаболизм азота, регуляция 164, 165
- лактозы, регуляция 163
- Метаболические яды
- арсенит 73
 - малонат 92
 - яд паука 63
- Метанобразующие бактерии, метаболизм 82, 83
- dam*-Метилаза 175
- Метилазы 171
- Метилирование, и контроль экспрессии генов 171, 174–177
- и стабильность транскрипционных комплексов 174–176
 - и хемотаксис 234–236
- Метилированные пурины, и МННГ 21, 22
- N-Метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (МННГ) 20–22
- Метилнитрозомочевина (МНМ) 20, 21
- Метилтрансфераза, очистка 21, 22
- Метод торможения в геле 121, 122, 213, 214
- Механическая энергия 197, 198
- Миграция ветвей при рекомбинации ДНК 30, 31
- Микрококковая нуклеаза 134, 135
- Микроворсинки 48

- Микросомы, и перенос белков 112–114
 Микротрубочки 206–214, 252, 253
 Мини-хромосомы *Tetrahymena* 129–132
 Миобласты 161, 162, 272
 Миозин 193–198
 – биполярные филаменты 195
 – и саркомеры 193–195
 – и передача свободной химической энергии 197, 198
 – сборка белка 195
 – структура «витой канат» 210, 211
 Миомезин 195
 Миорелаксанты 216
 Миристилирование, и *v-src* 248–250
 Миссенс-мутации 19
 Митоз 237–258
 индекс 238
 – и клеточный цикл 237–241
 – репродукция полюсов 255, 256
 – сегрегация плазмид 253, 254
 – сегрегация хромосом 252–258
 – синхронизация 239
 Митохондрии 71–84
 – и митоз 253, 254
 – импорт белков 107, 108
 – мутанты 98
 – окисление жирных кислот 72
 – поглощение O_2 82
 – репликация ДНК 95, 96
 – соотношение Р/О 81, 82
 – стереохимия синтеза АТФ 79, 80
 – транскрипция ДНК 96
 – субстратное фосфорилирование 75
 – ADP/АТФ-транслоказа 76, 77
 – электронтранспортная цепь 77–84
 – эндосимбиотическое происхождение 99
 Морские ежи, митоз в яйцах 255, 256
 – – яйца 230
 Морфогенез слюнных желез 266–268
 Мутанты бактериофага Т4 35, 36
 – *Neurospora* 97, 98
 – *Chlamydomonas* 204
 Мутации жгутиков 204–206
 – и гиперхолестеролемиа 67–70
 – и I-клеточная болезнь 123
 – и ретинобластома 250, 251
 – и синдром Гюнтера 122
 – и синдром Хёрлера 122, 123
 – коллагена 268–270
 – миссенс-мутации 19, 20
 – мутагены 20–22
 – по процессингу олигосахаридов 119
 – по типу спаривания 174
 – по ядерному транспорту 105, 106
 – распределение 19
 – ретровирусные мутагены 271, 272
 – со сдвигом рамки 11, 19
 – температурочувствительные 27, 106
 – условно летальные 27, 106
 – УФ-индуцированные 16–18
 – хемотаксических рецепторов 230–232
 – *cdc* 242
 – *poky* 97, 98
 – *pet* 494 98
 – *pf14* 205
 – *r* 35, 36
 – *dunce* 230–232
 Муцин, и клеточная адгезия 276, 277
 Мышечное сокращение 193–197
 – – аэробный тип 194
 Мышцы 72–74, 276
 и длина саркомера 197
 – и ТАР 199–201
 – и передача свободной химической энергии поперечнополосатые 195
 – сборка актина, эффект цитохалазина В 200
 – сокращение 193–198
 – филаменты актина 198–202
 – филаменты миозина 193–197
 ($Na^+ + K^+$)-Насос 60–62
 Нейраминидаза, и клеточная адгезия 277
 – обработка эритроцитов 47, 48
 Нейроны см. Нервные клетки
 Нексин 203
 Нематоды 155, 156
 Нервные клетки, и альтернативный сплайсинг 179, 180
 – – гигантский аксон кальмара 61, 62
 – – и клеточная адгезия 276, 277
 – – и микротрубочки 212
 – – и ретинобластома 250, 251
 – – потенциал-зависимые N^+ -каналы 63
 – – рост аксонов 213, 214
 Нерепликативная транспозиция 39
 Никотиновый ацетилхолиновый рецептор 234
 Нити напряжения 194
 o-Нитрофенил-(α,β)-D-ксилозид 267, 268
 Нозерн-блоттинг 183, 272
 Норадреналин 226, 227
 – и α_1 -адренергические рецепторы 227
 – и частота сокращений клеток сердца 263, 264
 Нуклеоплазмин 105
 Нуклеосомы, в области центромеры 135, 136
 – и расщепление ДНКазой I 135
 – и экспрессия генов 139
 – у гипотетического микроорганизма 135
 Обмен генетическим материалом между органеллами 97
 Обработка протеазами 66, 67, 119–121
 Обратная транскриптаза 37, 40
 Однонаправленная репликация 25, 26
 Окисление, жирных кислот 72
 цикл лимонной кислоты 72–74
 цитохромы митохондрий 80, 81
 – цитохромы хлоропластов 89, 90
 Олигомицин 60, 61
 Олигонуклеотиды 44, 153, 184, 185
 Олигосахариды, процессинг и перенос 55, 56, 117–119
 – N-связанные 118, 121
 Онкогены, и ретинобластома 250, 251
 c-fos 183, 184
 – *myc* 251, 252
 – *ras* 251, 252
 – *sis* 223
 – *v-src* 248–250

- araBAD*-Оперон 166, 167
Опухоли 247–252
– и промежуточные филаменты 209–211
– и MMTV 251, 252
Орнитиндекарбоксилаза 104
SOS-ответ 18, 19
Ошибочное встраивание, и повреждение УФ 17, 18
– при синтезе белка 13, 14
- Пептиды, амфипатические спирали 108
– и прикрепление клеток 270, 271
– и сборка коллагена 268–270
– образование связей 9, 10
– скорость роста цепи 13
Перекрывающиеся гены 40
Переносчики фосфолипидов 50, 51
Перескок липидов в мембране (флип-флоп) 50, 51
Перинуклеарные эндосомы 65
Пероксидаза хрена 70, 264
Пероксисомы 109–111
Пиримидиновые димеры 16–18
Пируват, и гликолиз 75, 76
Плазма, и фактор *Виллебранда* 275, 276
Плазматическая мембрана 46–70
– белки 51–55
– белки-переносчики 59–61
– и эндоплазматический ретикулум 100, 101
– углеводы 55–57
– участки молекул, пронизывающие мембрану 119–121
– холестерол 67–70
Плазмиды, автономно реплицирующиеся последовательности (ARS) 142, 143
– векторы клонирования 40, 41
– и изучение нуклеосом 135, 136
Пластоцианин 108, 109
Плотные контакты, структура 260, 261
– электрическое сопротивление 261, 263
Полиаденилирование 152, 153
Полиакриламидные гели 29–31, 130, 131, 134, 211, 213
Полисахариды, и внеклеточный матрикс 265–267
Полирибосомы 15
Полисомы 181
Политенные хромосомы 138
Половое развитие, и дефект рецепторов гормона 219
Полудесмосомы 260
Полуконсервативная репликация ДНК 23
Полюса веретена, репродукция 255, 256
Полусная релаксация 257
Полярность ДНК 23, 24
Alu-Последовательности 191, 192
Последовательности ARS 142, 143
– CEN3 135, 136
Посттранскрипционный контроль 178–185
Потенциал действия 61
– покоя 61–63
Потоки ионов через клеточную мембрану 60–62
Правило «А» 17, 18
Праймосома фага Т4 25
Превращение энергии 71–99
– в митохондриях 71–77
– в хлоропластах 84–93
– и движение 197, 198
- АТФ-синтаза 84
– эволюция электронтранспортных цепей 93
Препарат измельченных мышц голубя, и цикл лимонной кислоты 72–74
Прогестерон, и созревание ооцитов 240, 241
Проколлаген, образование 268
Промежуточные филаменты 209–211
Проназа, в экспериментах по адгезии клеток 277
– обработка теней эритроцитов 53
Простагландин E_2 226
Протеинкиназа С 223
Протеогликаны 266–268
Процессинг, олигосахаридов 119–121
– РНК, альтернативный 96, 140
Псевдохолинэстераза 216
Пуфы, влияние экдизона 221, 222
- Радиальные спицы 203, 204
Радиоавтография 13, 29, 30, 44, 124, 125, 172, 173, 213, 246
Радиоиммуноанализ (РИА) 216–218
Развитие желез 266–268
– яйца, и экспрессия генов 144–146
Рак 247–252
– и промотор MMTV 251, 252
– контроль клеточного роста 244
– химиотерапия 20
Растения, хлоропласты и фотосинтез 84–91
– ДНК митохондрий и хлоропластов 93–99
Реакции переноса фосфата, стереохимия 79, 80
Регуляторные белки 158–192
Рекombинация ДНК, механизмы 28–33
– и SSB-белок 29, 30
– начальный этап спаривания 30
– субстраты 29
– Хи-сайты 29, 30
Ренатурация (гибридизация) ДНК 28, 39, 172
Репарация ДНК 19–23
Репликативная транспозиция 39, 40
Репликация ДНК, механизмы 22–28, 33–40. *См. также* ДНК; Синтез ДНК
Репрессор гем-контролирующий 181, 182
Реснички, движение 202–204
– строение 205, 206
– и превращение свободной энергии 197, 198
Рестриктазы 42–44, 127–157
Ретиналь 224
Ретровирусы 37, 178
– жизненный цикл 37
– инсерционный мутагенез 271, 272
– интеграция 37
Рецептор маннозо-6-фосфата 123
Рецепторы *см.* Белки-рецепторы
Рибонуклеиновая кислота *см.* РНК
Рибонуклеотидредуктаза 239
Рибосомные мини-хромосомы у *Tetrahymena* 129–132
Рибосомы
– и перенос белков в митохондрии 107–108
– в ЭР 113, 114
– сдвиг рамки считывания 11
– синтез белка 12, 15
– Р-участок 9
РНК 158–170

- гибриды с ДНК 151-154
 - и вирусы 33-38
- и глутаминсинтетаза 164, 165
 - и синтез белка 9-15
- митохондриальная 96
 - праймеры для синтеза ДНК 25, 26
- транскрипционный комплекс 174, 175
 - транскрипция рРНК 150, 151
- у *Tetrahymena* 129, 130
- мРНК 146-157
 - гибридизация 110
 - гистоновая 153, 154
 - и циклогексимид 107, 108
- картирование 155, 156
- коллагена 271, 272
- митохондрии человека 96
- обогащение 41
- процессинг 96
- синтез ферритина 181
- синтез белка 9, 10, 12, 13
- скорость синтеза глобина 13
 - трансляция и транслокация 111-114
- фага ϕ X174 40
- тРНК, антикодон 10
 - процессинг в митохондриях 96
- РНКазы Н 153, 154
- РНК-затравка, и праймаза 25
- РНК-праймаза 25
- РНК-полимераза 113, 114, 164-167
- Родопсин 188, 189, 224
- Рост бактериофага Т4 34, 35
 - клеток 237-247
 - и РФТ 245
 - и Poly(HEMA) 244
- Сайт-направленный мутагенез 44, 45
- Саркоплазматический ретикулум, кальциевый насос 59
- Светлая полоса, и мышечное сокращение 195
- Секвенирующий гель 44, 45
- Секреторные везикулы, механизмы транспорта 123, 126
 - клетки 100
- Секреция белков 123-125
- Сиаловая кислота, и адгезия клеток 46, 276, 277
- Сиалидаза, обработка клеток 53
- Сигнал для сортировки белков 125
- Сигнализация клеточная 215-236
 - адаптация клеток-мишеней 182-185
 - и ионы кальция 227-230
 - и стероидные гормоны 219, 221
 - и сАМР 227, 228, 230-232
- нервные клетки 59
- с участием рецепторов клеточной поверхности 222-227
- синаптическая 215, 218
- Сигнальные пептиды 102, 107, 108, 111, 112
 - участки белков 102
- Сигналы, для деградации 102-104
 - переноса в ядро 105
 - сортировки 124, 125
 - стероидные гормоны 219, 221
- Синаптическая сигнализация 215, 218
- Синдром *Картагенера* 203
- Синтез белка 9-15, 178-182
 - гем-контролирующий репрессор 181, 182
 - использование кодонов у *Tetrahymena* 11
 - и деградация белка 102, 103
 - и созревание ооцитов 240, 241
 - сдвиг рамки считывания 11
 - скорость 13
 - точность 14, 15
 - элонгация 12-15
- Синтез глобина 12, 13, 181, 182
 - и ген β -глобина 132
- Синтез ДНК 140, 146. См. также ДНК; Репликация ДНК
 - и оплодотворение яйца лягушки 145, 146
 - и продолжительность клеточного цикла 238, 239
 - у дрожжей 241-243
- Синтез РНК 146, 157. См. также ДНК; Репликация ДНК
- АТФ-синтетаза 77-84
- Скрещивание брат $\times$ сестра, и мутации 272
- Слюнные железы, пuffs в хромосомах 221, 222
 - развитие у мышей 266-268
 - у *Drosophila* 221, 222
- Сокращение терминальной сети, и АТФ 199, 200
- Соматомедин С, и рост клеток 245, 246
- Сортировка белков 125
 - у *Neurospora* 97, 98
- Спаривание, регуляция типа у дрожжей 172-174, 277, 278
 - у *Chlamydomonas* 205
- Спектр действия 88
- Спектрин 52-54
- Спектроскопия ЭПР 49, 51
- Спермии, акросомальная реакция 201, 202
 - и актин 199
- α -спирали эластина 266
- Спирально-круговая проекция аминокислотной последовательности 108
- Сплайсинг РНК 155, 157, 179, 180
- Стероидные гормоны, как сигналы 219, 221
- Стероиды 219, 221, 222
- Стимуляция звездами 258
- Строма хлоропластов 108, 109
- Субтрактивная гибридизация 161, 162
- Сукцинат, и дыхательная цепь 72-74
- Сукцинилхолин 216
- Сфингомиелин 48
- Сфингомиелиназа 48, 49
- Z-Схема фотосинтеза 88-90
- Таксол 207
 - и движение хромосом 253
- Теломеры, структура 130
- Темная полоса, и мышечное сокращение 195
- Температурочувствительные мутанты 27, 242
- «Тени» эритроцитов 53, 56
- Тест с кружками, и мутантные фаги 35, 36
- Тестостерон 219
- Тилакоиды 108, 109
- Тиреоидный гормон 218
- Тирозин-специфическая протеинкиназа 248-250
- Тиоксин 218
- Титин, и мышечное сокращение 195
- Тканевой активатор плазминогена 263
- Ткани, формирование 273
- Токсин, кривая связывания 63

- Топоизомераза ДНК 23
 Торможение в геле, метод 160, 161, 168, 169
 Точечная матрица 132
 Точка начала репликации (*ori*), и Т-антиген 40, 144
 --- и функция центромеры 253, 254
 --- электронная микроскопия 24
 --- ARS у дрожжей 142, 143
 - удара 242, 243
 Тканеспецифический сплайсинг 179, 180
 Трансгенные животные 41, 42
 Трансдукция 223
 Транскрипция, контроль инициации 162–170
 - организация и эволюция ядерного генома 185–192
 - посттранскрипционный контроль 178–185
 - рибосомной РНК 150, 151
 - транскрипционные комплексы 174, 175
 факторы 167, 168
 TFIID 146, 149
 ADP/ATP-транслоказа 76, 77
 Трансляция см. Синтез белка
 Транспозаза 34
 Транспозиция, репликативная и нерепликативная 39, 40
 Транспозон Tn10 39, 40
 Транспорт белков и РНК 107–126
 - в везикулах 123, 126
 - в митохондриях 107–109
 - в хлоропласты 107–109
 - глюкозы, и инсулин 59, 60
 - и аппарат Гольджи 117, 126
 и ЭР 111–117
 крупных молекул через мембрану 64, 70
 - малых молекул через мембрану 57–64
 - электронов 81
 Транспортные белки 59–61, 63
 Трансплайсинг 156, 157
 Трансферрин 65–67, 124, 125
 Трипаносомы 110, 150
 Трипсин, и клеточная адгезия 277, 278
 Тритон, клеточное деление 239, 240
 - хромосомы типа ламповых щеток 137
 Тромбоциты, и репарация повреждений кровеносных сосудов 275, 276
 - свертывание крови 229, 230
 Тропомиозин, и промежуточные филаменты 210
 Тропонин, и миозин 194
 Тубулин 207, 209
 - концентрация 202, 203
 - превращения микротрубочек, декорированных тубулином 208, 209

 Убикитин 102–104
 Увоморулин (L-CAM), и компактизация зародыша 273
 Углеводы, мембранные 55–57
 - олигосахариды 55, 56, 117–121
 - строение боковых цепей 265, 267
 - удлинение заправки, и картирование РНК 155, 156
 Ультрафиолет см. УФ-доза, УФ-индуцированные мутации
 Уравнение Нернста 60, 61, 92
 Условно летальные мутации 27
 УФ-доза, и выживание клеток 16, 17
 - и правило «А» 17, 18
 УФ-индуцированные мутации 19, 20

 повреждения РНК 150, 151

 М-Фаза клеточного цикла 237–239, 253
 Фактор запуска М-фазы (MPF) 240, 241
 - роста эпидермиса (ФРЭ) 70, 245–247
 - Виллебранда 275, 276
 TFIID 146, 149
 Факторы терминации 13, 14
 Фенилуксусная кислота 72
 Ферменты 215, 236
 и клеточная сигнализация 215, 236
 и инсулин 59, 60
 рестриктазы 42–44, 127–157
 - *Tetrahymena* 129, 130
 Ферредоксин 108, 109
 Ферритин 65, 69, 70, 171
 Фибробласты 272
 - ДНК 139, 140
 - и скрещивание брат × сестра 271
 - контроль клеточного деления 246, 247
 Фибронектин 266, 270, 271
 Филаменты актиновые 193–202
 - глиальные 209
 - миозина 193–197
 - модель скольжения 197
 - промежуточные 209–211
 Флагеллин, и переключение фаз у *Salmonella* 172
 ошибки в синтезе 14, 15
 Флуоресцеин, и оплодотворенные яйца мыши 264
 Флуоресценция, эксперименты с липосомами 261
 Флуорохром SITS 48, 49
 Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) 263, 264
 Форболовый эфир 160, 223, 226
 Фосфатидилсерин 48, 49
 Фосфатидилхолин 48, 116, 117
 - и белок-переносчик 116, 117
 Фосфатидилэтаноламин 48
 Фосфоглицерат, и гликолиз 75, 76
 Фосфоглицераткиназа 110
 Фосфодиэстераза cAMP 227, 228, 231
 - cGMP 224
 Фосфолипиды 46–51, 116, 117
 - белки-переносчики 116, 117
 - диффузия через плотные контакты 260, 261
 - и спектроскопия ЭПР 49–51
 - меченные нитроксильным радикалом 49, 50
 - распределение в эритроцитах 48, 49
 - спин-меченные 49–51
 - скорость перескока 50, 51
 Фосфорилирование 212, 213
 - белка ntrC 164, 165
 - и десенситизация 233
 - и созревание яиц 240, 241
 и распределение пигментов в клетках-меланофорах 212
 - и ядерные ламины 210, 211
 и Ca²⁺ и cAMP 226–232
 легких цепей миозина 229, 230
 - при трансформации клеток 248–250
 Фосфонолпируват 75–77
 Фотосинтез 84–91
 - и хроматические переходы 89
 синтез АТР 91

- спектр действия 88–90
- Z-схема 88–90
- фиксация CO_2 85–87
- C_3 - и C_4 -растения 87
- Фотофосфорилирование 84–86, 91–93
- Фумарат 73

- Хемосинтез 91–93
- Хемотаксис, рецепторы 232, 234–236
- Химическая сигнализация 215–236. *См. также* Сигнализация клеточная
- Хи-сайты 29
- Хлорамфеникол 20, 169, 170
- Хлоропласты 82, 84–97, 107–109
- Хлорофилл 85, 86
- Хлороформ, и фаг T4 34, 35
- Холестерол 48, 67, 218, 219
- и метаболизм ЛНП 67–70
- Хондроитинсульфат, и клеточная адгезия 277
- Хондроциты, и скрещивание брат $\times$ сестра 272
- Хроматин, нуклеосомы 135, 136
- петли 137, 138
- Хроматические переходы 88, 89
- Хромосомы 127–157
- гены белков хориона 144, 145
- ФГК 110
- *Drosophila* 230, 231
- ДНК и белки 127–136
- диски и междисковые участки 138
- и генный контроль 158–162
- и меркаптоэтанол 255, 256
- и метаболизм арабинозы 161
- и механизмы дифференцировки 170–178
- и мутанты *pet494* 98
- и промежуточные филаменты 209–211
- и сигнализация 257, 258
- и синтез РНК 146–157
- механизмы репликации 140–146
- метод «прогулка по хромосоме» 41
- окрашивание дифференциальное 137
- организация ядерного генома 185–192
- политенные 137, 138
- посттранскрипционный контроль 178–185
- природа мутаций 19–22
- пуфы 137, 221, 222
- распределение мутаций 19
- связь с микротрубочками 256, 257
- G-сегменты и R-сегменты 137
- структура 136–140
- типа ламповых щеток 137, 138
- центромера (CEN3) 135, 136
- эволюция ядерного генома 191, 192
- *Tetrahymena* 129–132

- Цветное зрение 188–190
- Центриоли 203
- Центромера 135, 136
- Центросомы 203, 207–209
- процесс расщепления 255, 256
- связь с хромосомами 256, 257
- Цианид 78, 92
- Цианобактерии 93
- Цикл лимонной кислоты 72–74
- Циклический АМР (сАМР), и гены *Drosophila* 230, 231
- и десенситизация 232, 233
- и ионы Ca^{2+} 226–232
- и клетки сердца 263, 264
- и клеточная адгезия 273, 274
- и клеточная сигнализация 221
- и меланофорные клетки 212, 213
- и мухи *dunce* 230–232
- механизмы действия 226–232
- Циклогексимидаз 221, 222
- действие 107, 108
- и синтез белка 15
- и синтез гликозаминогликана 268–270
- и созревание ооцитов 240, 241
- Цитозольный компартмент 102–104
- Цитокинез 237
- механизмы 252–258
- определение 257, 258
- Цитоплазма, гигантского аксона кальмара 61, 62
- деление 252, 253
- и М-фаза клеточного цикла 237
- Цитоскелет 193–214
- и контроль клеточного деления 244
- и мышечное сокращение 193–198
- организация 211–214
- филаменты 102
- актина 198–202
- Цитохалазин 212
- Цитохалазин В 56, 200
- Цитохромоксидаза, и мутация *pet494* 98, 99
- Цитохромы 78–91
- Цитрат, и цикл лимонной кислоты 73–74
- Цуккини 97

- Щавелево-уксусная кислота 73, 74
- Щелевые контакты 260
- Щелочная фосфатаза 115, 116, 122, 210, 211

- Эдеин, и синтез белка 15
- Экдизон 220, 221
- Экзоны и интроны 154, 155
- Экзоцитоз 64–70
- Экспрессирующий вектор 41
- Эластин 266
- Эластические волокна 265
- Электронная микроскопия 24, 27, 31, 32, 172, 195, 200, 203
- Электрическое сопротивление, и плотные контакты 261–263
- Электроглотранспортные цепи, эволюция 93
- Электрофорез в агарозном геле
- ДНК 25, 97, 129–131, 134–136, 138, 220
- РНК 148, 150, 151, 177, 183, 272
- Электрофорез в ПААГ с ДСН 30, 31, 38, 52–54, 56, 102–104, 108, 112–114, 124, 125, 131, 168, 211, 213
- Электрохимический протонный градиент 107
- и подвижность 83, 84
- и синтез АТР 78–80, 91
- Эмбриональное развитие, факторы 264
- Энгельман Т. 88
- Эндогликозидаза Н (эндо-Н) 85–87, 92, 93, 112, 113, 119–121

- Эндокринная сигнализация 215–221. *См. также* Сигнализация
- и стероидные гормоны 219
- АП-Эндонуклеаза 16
- Эндоплазматический ретикулум (ЭР) 101, 111–117, 124–125
- Эндоцитоз 64–70, 125, 232
- Эндосомы 67, 124
- Энергия электронов 85, 86, 89, 90
- Энолпируват, и гликолиз 75, 76
- Эпителиальные клетки, и внеклеточный матрикс 264–266
- и промежуточные филаменты 209
 - и ФРЭ 64, 65
 - контакты 259–263
 - участки 123, 124
 - уха 212
 - эксперименты с липосомами 261
- Эпителий кишечника 64
- поляризованный, и сортировка белков 125
 - репарация повреждений 275, 276
- Эритроциты 48–51
- мембранные белки 51–55
 - транспорт фосфолипидов 116, 117
 - цыпленка 139
 - экспрессия генов и структура хроматина 139, 140
- Эстрадиол 219
- Эукариотические клетки, и контроль клеточного деления 243–247
- Ядерный ламин С** 210, 211
- Ядро** 237–252
- и репликация хромосом 140–146
 - и синтез РНК 146–157
 - нуклеоплазмин 105
 - расщепление гибридов РНК–ДНК 151, 152
 - сайт-направленный мутагенез 44, 45
 - транспорт белков и РНК 107–109
 - хромосомные ДНК и белки 127–136
 - *Tetrahymena* 129, 130
- Яды** *см. также* Антибиотики; Ингибиторы
- арсенит 73
 - змеиный яд 47–49
 - коклюшный токсин 226
 - малонат 73, 82
 - токсин из паука 63
 - холерный токсин 228
 - цианид 78, 82
- Яйца моллюсков, активация** 63
- морского ежа, и клеточное деление 255, 256
 - мыши 264
 - *Xenopus*, ранние стадии развития 253, 257
- Ящерица, деление клеток** 239, 240

Список латинских названий организмов

- Escherichia coli* 10, 15–32, 34, 35, 57, 115, 146, 161, 170, 172, 175, 232, 234, 254, 274
- Bacillus licheniformis* 11
- Chlamydomonas* 203–206
- Chlorella* 88
- Dictyostelium discoideum* 272, 273
- Drosophila melanogaster* 138, 144, 178, 221, 231, 232
- Halobacterium halobium* 51
- Hansenula wingei* 277, 278
- Metanosarcina barkeri* 82, 83
- Neisseria gonorrhoeae* 171
- Neurospora* 97, 98
- Saccharomyces cerevisiae* 190, 191, 241–243
- Salmonella* 171, 172
- Salmonella typhimurium* 232, 234
- Schizosaccharomyces pombe* 241
- Streptococcus* 83
- Tetrahymena* 11, 129–132, 203
- Thiobacillus ferrooxidans* 91–93
- Xenopus* 174, 253, 257

Оглавление

От редакции	5
Предисловие к английскому изданию	6
Благодарности	7
К читателям	8

Вопросы Ответы

Глава 5. Основные генетические механизмы	9	280
Синтез РНК и белка	9	280
Механизмы репарации ДНК	15	287
Механизмы репликации ДНК	22	291
Механизмы генетической рекомбинации	28	296
Вирусы, плазмиды и транспозоны	33	300
Клонирование ДНК и генная инженерия	40	306
Глава 6. Плазматическая мембрана	46	311
Липидный бислой	46	311
Мембранные белки	51	315
Мембранные углеводы	55	319
Транспорт через мембрану малых молекул	57	320
Мембранный транспорт макромолекул и частиц: экзоцитоз и эндоцитоз	64	327
Глава 7. Преобразование энергии: митохондрии и хлоропласты	71	333
Митохондрии	71	333
Дыхательная цепь и АТР-синтетаза	77	339
Хлоропласты и фотосинтез	84	347
Эволюция электротранспортных цепей	93	356
Геномы митохондрий и хлоропластов	93	356
Глава 8. Внутриклеточная сортировка макромолекул и сохранение клеточных компартментов	100	362
Компартментация в клетках высших организмов	100	362
Цитозоль	102	363
Транспорт молекул белков и РНК в ядро и из ядра	104	365
Транспорт белков в митохондрии и хлоропласты	107	367
Пероксисомы	109	371
Эндоплазматический ретикулум	111	372
Аппарат Гольджи	117	376
Транспорт белков из аппарата Гольджи в лизосомы	121	379
Транспорт из аппарата Гольджи в секреторные везикулы и к поверхности клетки	123	381
Везикулярный транспорт и сохранение индивидуальности компартментов	125	382

Глава 9. Клеточное ядро	127	383
ДНК и белки, входящие в состав хромосом	127	383
Структура хромосомы	136	391
Репликация хромосом	140	394
Синтез и процессинг РНК	146	398
Глава 10. Контроль генной экспрессии	158	407
Стратегии генетического контроля	158	407
Контроль инициации транскрипции	162	409
Молекулярно-генетические механизмы образования различных типов клеток	170	414
Посттранскрипционный контроль	178	420
Организация и эволюция ядерного генома	185	426
Глава 11. Цитоскелет	193	434
Мышечное сокращение	193	434
Актиновые филаменты и клеточный кортекс	198	438
Движение ресничек	202	441
Микротрубочки цитоплазмы	206	445
Промежуточные филаменты	209	448
Организация цитоскелета	211	450
Глава 12. Межклеточная сигнализация	215	453
Три системы химической сигнализации: эндокринная, паракринная и синаптическая	215	453
Сигнализация с участием внутриклеточных рецепторов: механизмы действия стероидных гормонов	218	456
Механизмы передачи сигналов белками-рецепторами клеточной поверхности	222	459
Механизмы действия циклического АМР и ионов кальция	227	463
Адаптация клеток-мишеней	232	468
Глава 13. Рост и деление клеток	237	472
Фазы клеточного цикла и их причинная взаимосвязь	237	472
Дрожжи как модельная система	241	475
Регуляция клеточного деления у многоклеточных орга- низмов	243	477
Гены «социального контроля» клеточного деления	247	479
Механика клеточного деления	252	482
Глава 14. Клеточная адгезия, соединения между клетками и внеклеточный матрикс	259	489
Клеточные соединения	259	489
Внеклеточный матрикс	264	492
Межклеточное узнавание и адгезия	272	497
Приложение		501
Предметный указатель		505

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:

129820, Москва

1-й Рижский пер., д. 2,

издательство «Мир»

Джон Уилсон, Тим Хант

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

СБОРНИК ЗАДАЧ

Зав. редакцией канд. биол. наук М. Д. Гроздова
Консультант редакции акад. Российской АН Т. М. Турпаев
Ведущий редактор О. Ю. Сенцова
Редактор И. А. Ермакова
Художник Е. И. Волков
Художественные редакторы А. Е. Волков, Л. М. Аленичева
Технические редакторы М. А. Страшнова, И. И. Володина
Корректор С. С. Суставова

ИБ № 7585

Лицензия Л.Р. № 010174 от 22.01.92 г.

Сдано в набор 6.03.92. Подписано к печати 18.10.93. Формат 84 × 108^{1/16}. Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура таймс. Объем 16,25 бум. л. Усл. печ. л. 54,6. Усл. кр.-отт. 55,02. Уч.-изд. л. 45,48. Изд. № 4/7833. Тираж 8000 экз. Зак. 1428. С 008.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР» Министерства печати и информации
Российской Федерации
129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2.

Можайский полиграфкомбинат
Министерства печати и информации
Российской Федерации.
143200, г. Можайск, ул. Мира, 93.

Джон Уилсон

получил докторскую степень в Калифорнийском технологическом институте в 1971 г.; в настоящее время — профессор биохимии и молекулярной генетики в медицинском колледже, Хьюстон, Техас. Один из авторов книг по биохимии (*Biochemistry: A Problem Approach*) и иммунологии (*Immunology*). Занимается изучением генетической рекомбинации и перестроек генома в животных клетках.

Тим Хант

получил докторскую степень в Кембриджском университете в 1968 г., в настоящее время читает курс лекций на кафедре биохимии в Кембриджском университете, Кембридж, Великобритания. Работает в области изучения синтеза белка и регуляции клеточного цикла.